

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Kristina Kožić, 865/BPI

**ODREĐIVANJE  
FERMENTACIJSKE AROME U  
BIJELOM VINU DOMAĆE  
PROIZVODNJE**

Ovaj je diplomski rad izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Vesne Zechner-Krpan te uz pomoć dr. sc. Antonije Trontel.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Vesni Zechner-Krpan, svojoj mentorici, koja mi je susretljivošću i razumijevanjem pomogla pri izvedbi eksperimentalnog dijela i izradi pisanog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Antoniji Trontel na svim korisnim savjetima, trudu i velikoj pomoći prilikom pripreme i izrade ovog rada.*

*Veliko hvala svim članovima ovog Laboratorija na susretljivosti i pomoći.*

*Zahvaljujem se mojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška za vrijeme trajanja studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### ODREĐIVANJE FERMENTACIJSKE AROME U BIJELOM VINU DOMAĆE PROIZVODNJE

Kristina Kožić, 865/BPI

**Sažetak:** Aromu vina čine brojni hlapljivi spojevi koji potječu iz grožđa ili nastaju tijekom fermentacije i dozrijevanja vina. Najvažniji spojevi arome, čija koncentracija iznosi od 0,8 do 1,2 g L<sup>-1</sup>, sintetiziraju se tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije metabolizmom kvasaca i bakterija. Najznačajniji hlapljivi spojevi u vinu su viši alkoholi, esteri te monoterpenski alkoholi, koji su nositelji cvjetnih i voćnih aroma. Za određivanje viših alkohola, estera i aldehida u domaćem bijelom vinu proizvedenom 2016. godine kupажiranjem sorti Rajnski rizling, Pinot sivi i Pinot bijeli, korištene su plinska kromatografija (GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Provedene su i kemijske analize određivanja koncentracije neprevrelog šećera, slobodnog, vezanog i ukupnog sumpora, ukupnih i hlapljivih kiselina te etanola. Etanol je također određen denzimetrijskom metodom i HPLC-om. Glicerol je određen pomoću enzimskog kita i HPLC metode. Papirnom kromatografijom utvrđena je prisutnost jabučne i vinske kiseline dok mliječna, octena i limunska nisu detektirane, što je potvrđeno i HPLC metodom. Rezultati su pokazali da se analizirano domaće vino nalazi u okviru dopuštenih zakonskih granica te da je udio aromatičnih spojeva zadovoljavajući.

**Glavne riječi:** aroma, bijelo vino, GC metoda, HPLC metoda, kupажiranje

**Rad sadrži:** 49 stranica, 4 slike, 10 tablica, 47 literaturnih referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Antonija Trontel

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac
2. Prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan
3. Prof. dr. sc. Mara Banović
4. Prof. dr. sc. Karin Kovačević-Ganić (zamjena)

**Datum obrane:** 22. rujan 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Graduate Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

### AROMA DETERMINATION OF WHITE WINE BY DOMESTIC PRODUCTION

Kristina Kožić, 865/BPI

**Abstract:** Wine aroma consists of numerous volatile compounds that come from grapes or they are formed during the fermentation and wine maturation. The most important aroma compounds, ranging from 0.8 to 1.2 g L<sup>-1</sup>, are synthesized during alcoholic and malolactic fermentation by yeasts and bacteria. The most significant volatile compounds in wine are higher alcohols, esters and monoterpene alcohols, which are the carriers of floral and fruit aromas. Gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to determine higher alcohols, esters and aldehydes in domestic white wine produced in 2016 by blending Rhine riesling, Pinot gris and Pinot blanc. Chemical analyses for determination of ethanol, residual sugars, free, bound and total sulfur dioxide, total and volatile acids were also performed. Ethanol was also determined by densitometric method and HPLC. Glycerol was determined by the enzyme kit and HPLC. Paper chromatography showed the presence of malic and tartaric acid while lactic, acetic and citric were not detected, as confirmed by the HPLC method. The results have shown that analyzed domestic wine is within the legal limits allowed by wine regulation and that aromatic compound content is satisfactory.

**Key words:** aroma, blending, GC method, HPLC method, white wine

**Thesis contains:** 49 pages, 4 figures, 10 tables, 47 references

**Original in:** Croatian

**Graduate thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD. Vesna Zechner-Krpan, Full Professor

**Assistance:** PhD. Antonija Trontel

#### Reviewers:

1. PhD. Vlatka Petravić Tominac, Associate Professor
2. PhD. Vesna Zechner-Krpan, Full Professor
3. PhD. Mara Banović, Full Professor
4. PhD. Karin Kovačević-Ganić, Full Professor

**Paper defended:** 22<sup>nd</sup> September, 2017.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	2
2.1. Vino	2
2.2. Kupažiranje vina	2
2.2.1. Karakteristike sorte Rajnski rizling	3
2.2.2. Karakteristike sorata Sivi i Bijeli pinot	3
2.3. Uloga kvasca tijekom fermentacije	4
2.3.1. Mikroflora grožđa u spontanoj fermentaciji	5
2.3.1.1. Kvasci na grožđu	5
2.3.1.2. Kvasci u vinariji	5
2.3.1.3. Spontana alkoholna fermentacija	6
2.3.2. Kontrolirana alkoholna fermentacija	6
2.3.3. Selekcija vinskih kvasac	7
2.4. Aroma vina	7
2.4.1. Viši alkoholi	11
2.4.1.1. Utjecaj soja kvasca na proizvodnju viših alkohola	12
2.4.2. Esteri	13
2.4.2.1. Utjecaj soja kvasca na proizvodnju estera	14
2.4.3. Karbonilni spojevi	15
2.4.3.1. Aldehidi i ketoni	15
2.4.3.2. Utjecaj soja kvasca na koncentraciju aldehida	17
2.4.4. Hlapljivi fenoli	17
2.4.5. Hlapljive masne kiseline	18
2.4.5.1. Utjecaj soja kvasca na proizvodnju hlapljivih masnih kiselina	20
2.4.6. Sumporovi spojevi	20
2.4.6.1. Utjecaj soja kvasca na nastajanje sumporovih spojeva arome	21
2.4.7. Terpeni	22
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	23
3.1. Metode	23
3.1.1. Određivanje koncentracije šećera RS metodom	23
3.1.2. Određivanje ukupnih kiselina u vinu	24
3.1.3. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku	24

3.1.4. Određivanje sumporovog dioksida	25
3.1.5. Određivanje alkohola kemijskom metodom	26
3.1.6. Određivanje alkohola denzimetrijski	27
3.1.7. Enzimsko određivanje glicerola	28
3.1.8. Određivanje jabučne, mliječne, vinske, octane i limunske kiseline papirnom kromatografijom	30
3.1.9. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	31
3.1.10. Plinska kromatografija (GC)	32
3.1.10.1. Analiza hlapljivih komponenata pomoću plinske kromatografije	33
3.1.10.2. Analiza etanola pomoću plinske kromatografije	33
3.2. Materijali	35
3.3. Aparature	36
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	37
4.1. Rezultati	37
4.1.1. Rezultati plinske kromatografije	37
4.1.1.1. Rezultati analize hlapljivih spojeva u vinu pomoću plinske kromatografije	37
4.1.1.2 Rezultati analize etanola pomoću plinske kromatografije	38
4.1.2. Rezultati analize parametara vina kemijskom metodom	38
4.1.3. Rezultati određivanja etanola denzimetrijskom metodom	38
4.1.4. Rezultati određivanja glicerola	38
4.1.5. Rezultati papirne kromatografije	39
4.1.6. Rezultati analize dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	40
4.2. Rasprava	41
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	45
<b>6. LITERATURA</b>	46



## **1. UVOD**

U ovom radu analizirano je domaće bijelo vino Zlatarskog vinogorja, proizvedeno 2016. godine kupažiranjem sorata Rajnski rizling, Sivi pinot i Bijeli pinot. Kupažiranje vina je operacija kojom se miješanjem mošta dva ili više vina dobiva vino željenog sastava i senzorskih svojstava. Ono se može izvršiti gotovo u svim fazama proizvodnje vina, od kupažiranja šira do kupažiranja stabiliziranih vina neposredno pred flaširanje. Ciljevi kupažiranja vina mogu biti različiti, ali se u praksi ono najčešće vrši radi tipizacije vina, popravljivanja kvaliteta vina i otklanjanja nekih nedostataka vina. Kupažiranjem se može korigirati kiselost, sadržaj alkohola, sadržaj šećera, obojenost, fenolni karakter, svježina, gorčina, aroma, a često i nepoželjni mirisi i okusi vina (Blesić i sur., 2013). Aroma je karakteristično svojstvo hrane i rezultat je interakcija spojeva od kojih je hrana sastavljena. Aroma grožđa je vrlo složena i različite sorte grožđa sadrže različite spojeve. Alkoholna fermentacija je posebno važna za razvoj arome vina. Tijekom alkoholne fermentacije odvijaju se bitne promjene kojima spojevi arome mošta ili masulja prelaze u spojeve arome vina. Nastaju brojni hlapljivi spojevi, među kojima su, izuzev etanola, kvantitativno najzastupljeniji oni iz skupine viših alkohola, hlapljivih kiselina i estera. Tijekom odležavanja vina dolazi do njegovog daljnjeg dozrijevanja i starenja te razvoja postfermentativnih aroma, a tijekom starenja dolazi do oksidacije već postojećih aromatskih spojeva i ekstrakcije sastojaka iz bačve. Do sada je određeno oko 3000 različitih sastojaka u grožđu, moštu i vinu, a oko 2000 otpada na spojeve arome. Dokazano je da neke mirisne tvari, iako su prisutne u količini manjoj od ljudske senzorske osjetljivosti, utječu sinergistički na mirisnu komponentu vina (Anonymous 1, 2011).

Hlapljive komponente, etanol, organske kiseline, ugljikohidrati i glicerol analizirale su se pomoću plinske kromatografije (gas chromatography ili GC) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (high-performance liquid chromatography ili HPLC). Pomoću laboratorijskih kemijskih metoda određivale su se koncentracije šećera (RS metoda), ukupnih i hlapljivih kiselina, SO<sub>2</sub>, glicerola (pomoću enzimskih kitova), etanola (kemijski i denzimetrijski), jabučne, vinske, mliječne, limunske i octene kiseline (papirna kromatografija).

## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. Vino**

Zakon o vinu (2003) kaže da je vino poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnog grožđa. Sorte vinove loze za proizvodnju vina moraju pripadati vrsti *Vitis vinifera* ili križancima *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis*. U smislu ovog zakona vina se dijele na vina u užem smislu riječi (mirna, pjenušava, biser i gazirana vina) i specijalna vina (desertna, aromatizirana i likerska vina). Prema boji vina se razvrstavaju na bijela, ružičasta (rose, opolo) i crna (crvena). Što se tiče koncentracije neprevrelog šećera mirna vina se dijele na: suha, polusuha, poluslatka i slatka, a pjenušava, biser i gazirana vina na: vrlo suha, suha, polusuha, poluslatka i slatka. S obzirom na kakvoću prerađenog grožđa, urodom po hektaru, stupnju zrelosti grožđa, načinu prerade i njege, količini prirodnog etanola i drugih sastojaka te organoleptičkim (senzorskim) svojstvima, mirna vina se dijele na stolna vina bez oznake zemljopisnog podrijetla, stolna vina s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom (k.z.p.), kvalitetna vina s k.z.p., vrhunska vina s k.z.p. i s oznakom ograničenih vinorodnih područja, vrhunska vina s k.z.p. i oznakom specifičnih kontroliranih vinorodnih područja i predikatna vina s k.z.p. Kakvoća vina ovisi o njegovom kemijskom sastavu koji je vrlo složen te zbog toga nije moguće pouzdano odrediti točan broj sastojaka. Osim mjerenja fizikalnih veličina, kakvoća vina se procjenjuje i subjektivno (degustacijom, ocjenjivanjem boje, bistroće, mirisa i okusa).

## **2.2. Kupažiranje vina**

Kupažiranje vina je postupak miješanja vina čime vino dobiva poseban i jedinstven karakter. Cilj ovog postupka je dobivanje vina bolje kakvoće, odnosno postizanja optimalne boje, udjela alkohola, kiselosti i arome. Također, drugi važan cilj je i ekonomska isplativost, jer se na taj način dobivaju kvalitetna vina koja postižu veću cijenu na tržištu. Postoji nekoliko načina kupažiranja grožđa ili vina: kupažiranje različitih sorti grožđa, kupažiranje grožđa iz različitih vinograda, kupažiranje vina različitih godišta, kupažiranje vina dobivenih različitim procesima vinifikacije, kupažiranje vina različitih sorti grožđa (Boulton i sur., 1996). Ovaj proces može se provesti u bilo kojoj fazi proizvodnje vina, od miješanja mošta prije fermentacije do bilo koje slijedeće faze proizvodnje. Vrlo često se koristi za miješanje prekomjerno sumporenog s nedovoljno sumporenim vinom. Kupažiranjem se mogu ukloniti ili ublažiti neki nedostaci vina, a majstori kupaže su u stanju od dva ili više vina s npr. nepovoljnim sadržajima alkohola, kiselina, šećera i sl. stvoriti kupažirano vino dobre kvalitete.

Kod bijelih sorata se aromatične ili muškatne sorte vrlo često koriste kao „začin“ koji daje kompleksnost aromi vina. Svaka država ima svoje propise o kupažiranju i označavanju vina. Prema Zakonu o vinu RH (2003) vina mogu nositi oznaku sorte, ako su proizvedena od najmanje 85 % grožđa te sorte, a oznaku godine berbe mogu nositi vina koja sadrže najmanje 85 % vina iz godine berbe oznake koju nose. Zabranjeno je miješati stolno, kvalitetno ili vrhunsko vino sa specijalnim vinima; masulj, mošt ili vino plemenite vinove loze s proizvodima direktno rodni hibrida; zdrava vina s bolesnim vinima i vinima s manom i bijela vina s crnim vinima radi dobivanja ružičastih vina (Blesić i sur., 2013).

### 2.2.1. Karakteristike sorte Rajnski rizling

Ova sorta je jedan od najstarijih kultivara vinove loze u svijetu i smatra se najplemenitijom bijelom sortom, a potječe iz doline rijeke Rajne u Njemačkoj. Karakteristike su naglašena kiselost, punoća i elegantna aroma te plemeniti, diskretni miris. Vino proizvedeno od Rajnskog rizlinga je puno, zaokruženo, sa značajnim mirisom i aromom, ima dug životni vijek te je žuto zelenkaste boje. Starenjem njegova vrijednost u pravilu raste. Rajnski rizling (Slika 1) je i dobra podloga plemenitoj plijesni, koja se razvija na već zrelim bobicama što daje osnovu za odlična suha, ali i slatka vina s prirodnim neprevrelim šećerom. Mlado vino ima svježju voćnu aromu koja podsjeća na cvijet akacije, breskve, trešnje, a kod viših stupnjeva kvalitete i na cimet, med ili marelicu (Fazinić i Milat, 1994; Mirošević, 1996; Maletić i sur., 2015).



**Slika 1.** Grozd sorte Rajnski rizling (Anonymous 2, 2009)

### 2.2.2. Karakteristike sorata Pinot sivi i Pinot bijeli

Pinot sivi daje vino slamnato žute, ali s naznakom ružičaste boje. Sorta potječe iz Francuske i mutant je Pinota crnog. Podnosi razna tla, ali ne podnosi veliku vlagu i vapneno tlo te najbolje uspijeva u umjerenoj klimi. Okus vina ima arome breskve, začina i marelice.

Pokožica bobice je tanka i podložna botritisu (trulež koju uzrokuje siva plijesan) što omogućava proizvodnju botritiziranih vina. Pinot sivi (Slika 2, lijevo) je osjetljiv prema botritisu pa zbog toga zahtjeva neke posebne zahvate rezidbe naročito u uvjetima vlažne klime (Anonymous 3, 2013).

Pinot Bijeli (Slika 2, desno) je stara sorta grožđa, rasprostranjen je uglavnom u Njemačkoj i Italiji, a u Hrvatskoj ga najviše ima u Slavoniji. Nastao je spontanim križanjem Pinota sivog i Pinota crnog. Daje vino slamnato žute boje sa zelenkastim odsajem, a starenjem daje zlatnu boju. Laganog je okusa koji aromom podsjeća na jabuku i breskvu. Ova sorta nije prilagođena jako vlažnim i vapnenastim tlima, stoga najbolje uspijeva u suhoj klimi (Anonymous 4, 2013).



**Slika 2.** Sivi pinot (lijevo) (Anonymous 3, 2013) i Bijeli pinot (desno) (Anonymous 4, 2013)

### 2.3. Uloga kvasca tijekom fermentacije

Alkoholna fermentacija (anaerobni proces) je osnovni proces u vinarstvu koji podrazumijeva biokemijski proces u kojem se fermentabilni šećeri razgrađuju na etilni alkohol i ugljikov dioksid prema reakciji  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$  pomoću kvašćevih stanica i stanica nekih bakterija (Anonymous 5, 2014).

Tijekom fermentacije, kvasci koriste šećere i druge sastojke mošta kao supstrate za rast, prevodeći ih u etanol, ugljični dioksid i druge krajnje proizvode metabolizma koji doprinose kemijskom sastavu i senzorskoj kvaliteti vina. Fermentacijom se povećava kemijska složenost i kompleksnost okusa i mirisa, olakšava ekstrakcija spojeva iz čvrste faze prisutne u moštu te se proizvode značajne količine kvašćevog metabolita (Bisson, 1999; Pretorius, 2000). Da bi

potpuno shvatili ulogu kvasca u proizvodnji vina, potrebno je znati taksonomski identitet svake vrste koja pridonosi fermentaciji, kinetiku njenog rasta, biokemijska svojstva kvasaca i kemijske promjene koje oni izazivaju. Također su bitni i utjecaji vinifikacijskih čimbenika na kinetiku rasta i kemijske promjene tijekom vinifikacije. Izvor kvasaca odgovornih za alkoholnu fermentaciju može biti površina grožđa, površina opreme vinarije ili starter-kultura koja se dodaje moštu (Fleet i Heard, 1993).

### 2.3.1. Mikroflora grožđa u spontanoj fermentaciji

#### 2.3.1.1. Kvasci na grožđu

Na samoj površini grožđa prevladavaju kvasci iz rodova *Kloeckera* (najvše vrsta *Kloeckera apiculata*) i *Hanseniaspora*, ti rodovi zauzimaju 50-70% ukupne populacije kvasaca na grožđu. Također, prisutni su i kvasci iz rodova *Candida* (osobito vrsta *Candida stellata* i *Candida pulcherrima*), *Cryptococcus*, *Rhodothorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* i *Hansenula*. Broj stanica kvasaca *Kloeckera sp.*, *Candida sp.* i *Hansenula sp.* na grožđu iznosi  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{cm}^{-2}$  površine bobice. Kvasci iz roda *Saccharomyces* (npr. vrsta *Saccharomyces cerevisiae*) prisutni su u vrlo malom broju, tj. broj ovih izrazito fermentativnih kvasaca iznosi manje od 10 stanica po  $1 \text{ cm}^2$  površine bobice grožđa. Boulton i suradnici (1996) objavili su podjelu kvasaca:

- a) kvasci povezani s vinom – to su kvasci koji se mogu naći na grožđu, u vinima, u vinarijama ili opremi vinarija;
- b) divlji kvasci – kvasci koji ne spadaju u rod *Saccharomyces*, a mogu sudjelovati bar u početku fermentacije. To su rodovi *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Brettanomyces*, *Dekkera* i *Zygosaccharomyces*;
- c) vinski kvasci – sojevi kvasaca iz roda *Saccharomyces* koji mogu proizvesti potpunu fermentaciju mošta te daju ugodan miris i okus vinu. Vrste kvasaca iz roda *Schizosaccharomyces* također mogu potpuno fermentirati mošt. Međutim, prevladava mišljenje da su kvasci iz roda *Saccharomyces* prikladniji.

#### 2.3.1.2. Kvasci u vinariji

Na površini opreme u vinariji prevladava kvasac vrste *Saccharomyces cerevisiae*, a također se mogu naći i drugi kvasci poput kvasaca iz rodova *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* i *Brettanomyces*. Osim autohtonih kvasaca vrste *Saccharomyces cerevisiae* koji potječu s grožđa, na površinama vinarske opreme mogu se zadržati i sojevi koji potječu iz starter kultura korištenih u ranijim godinama (Fleet, 1993). Malik (1998) je podijelio kvasce prisutne na površinama vinarije u 3 skupine. U prvu skupinu spadaju kvasci koji se mogu smatrati

kontaminantima. Oni ne sudjeluju u spontanoj fermentaciji mošta i odgovorni su za mutnoću vina. Drugu skupinu čine vrste kvasaca s aerobnim metabolizmom odgovorni za nastajanje filma na površini vina. To su *Candida sp.*, *Pichia sp.* i *Hansenula sp.* Neke vrste iz roda *Candida* dospijevaju u vino s bačava, cjevovoda i zidova. U treću skupinu spadaju nesporogene vrste kvasaca iz rodova *Torulops* i *Sporobolomyces*. Izolirani su s podova i zidova vinarije te sa stijenki vanjskih cisterni.

#### 2.3.1.3. Spontana alkoholna fermentacija

Tijekom fermentacije, populacija kvasaca u moštu povećava se od početne koncentracije, koja iznosi  $10^4$ - $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>, do maksimalne vrijednosti  $10^8$ - $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>. Njihov se rast može usporediti s rastom mikroorganizama u šaržnoj kulturi pa tijekom fermentacije mošta također postoje lag faza, eksponencijalna faza, stacionarna faza i faza odumiranja (Fleet i Heard, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000). Fermentacija započinje rastom različitih vrsta kvasaca iz roda *Kloeckera* i *Hanseniaspora*. Rast tih vrsta inhibiran je etanolom već drugi ili treći dan fermentacije pa one odumiru. Zatim kvasci iz roda *Saccharomyces* preuzimaju fermentaciju jer imaju veću toleranciju prema etanolu te ostaju prisutni do samog kraja fermentacije (Malik, 1998). Kad fermentacija dosegne stacionarnu fazu ili fazu odumiranja metabolička aktivnost kvasaca je i dalje aktivna stoga oni i dalje fermentiraju preostale šećere uz proizvodnju etanola i ugljičnog dioksida. U ovoj fazi također nastaju i značajne količine sekundarnih spojeva kao što su acetaldehid, esteri i viši alkoholi (Fleet i Heard, 1993).

Spontana fermentacija u odsutnosti sumporovog dioksida može omogućiti opstanak divlje flore kvasaca, koji tada doprinosi cjelokupnom senzorskom karakteru vina. To može biti pozitivno jer pridonosi kompleksnosti vina. No, češće uzrokuje smanjenje kvalitete vina, što ovisi o vrsti grožđa i flori prisutnoj tijekom fermentacije. Utjecaj spontane fermentacije na okus i aromu vina ne može se predvidjeti, a djelovanjem divljih kvasaca i bakterija mogu nastati neki posebno neugodni okusi i arome koje je teško ukloniti iz gotovog vina. Mane spontane fermentacije također su nepredvidljivost početka i trajanja fermentacije (Boulton i sur., 1996).

#### 2.3.2. Kontrolirana alkoholna fermentacija

Kontrolirana fermentacija se provodi inokulacijom jednog selekcioniranog soja kvasca. Glavni razlog primjene određenih sojeva kvasaca je izbjegavanje proizvodnje nepoželjnih okusa koji povremeno nastaju spontanom fermentacijom. Osim toga, selektivnu upotrebu nekog soja može potaknuti namjera da se dobije posebna aroma, karakteristična za dodani kvasac (Jackson, 1994). Primjena određenog soja važna je ukoliko mošt potječe od pljesnivog



grožđa, jer ono usporava rast i metabolizam kvasca. Za inokulaciju se najčešće koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zbog svoje visoke tolerancije na etanol, sposobnosti rasta pri niskim pH vrijednostima (od 3 do 4) te pri visokim koncentracijama šećera (Moreira i sur., 2001).

### 2.3.3. Selekcija vinskih kvasaca

Selekcija kvasaca podrazumijeva odabir onih sojeva koji mogu učinkovito fermentirati mošt i proizvesti vino dobre kvalitete. Selekcija se provodi najčešće unutar vrste *Saccharomyces cerevisiae* zbog već ranije spomenutih njenih kvaliteta. Enološka svojstva kvasca ove vrste podijeljena su u dvije skupine: tehnološka i kvalitativna. Tehnološka svojstva utječu na učinkovitost fermentacijskog procesa. Iako sojevi kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae* posjeduju tehnološke karakteristike potrebne za provođenje fermentacije, istraživanje ovih svojstava ipak je neophodno, jer se sojevi međusobno razlikuju u većini ovih svojstava. Kvalitativna svojstva određuju kemijski sastav vina i utječu na njegove senzorske karakteristike. Enološka svojstva kvasaca mogu se istraživati provođenjem fermentacije sintetske podloge u malom mjerilu i na kraju fermentacije mošta. Tehnološka svojstva mogu se istražiti praćenjem kinetike fermentacije, a utjecaj kvasca na udjel sekundarne arome vina određivanjem tih sastojaka u vinu nakon fermentacije. Nakon toga se sa sojevima koji pokazuju najbolju kombinaciju enoloških svojstava mogu u većem mjerilu provesti fermentacije mošta podrijetlom od različitih sorta grožđa, a senzorske analize proizvedenih vina mogu omogućiti bolju karakterizaciju selekcioniranih sojeva (Raineri i Pretorius, 2000). Pri selekciji kvasaca za industrijsku proizvodnju vina istražuju se ove karakteristike: proizvodnja što manjih koncentracija nepoželjnih spojeva (sumporov dioksid, sumporovodik), brz početak i dobra brzina fermentacije, provođenje potpune fermentacije, otpornost na sumporov dioksid, otpornost na bakar, dobra temperaturna tolerancija, sposobnost flokulacije, sposobnost površinskog rasta, tvorba male količine pjene, killer fenotip, proizvodnja željenog fermentacijskog bouqueta, odvijanje fermentacije bez proizvodnje nepoželjnih okusa i aroma, dobra proizvodnja glicerola, niska proizvodnja acetaldehida, hlapljivih kiselina i octene kiseline, uree i etil-karbamata, dobro preživljavanje tijekom čuvanja. Ovisno o tipu vina poželjne su određene kombinacije spomenutih svojstava kvasaca. Neka svojstva su uvijek poželjna, a neka uvijek nepoželjna (Dittrich, 1995; Raineri i Pretorius, 2000).

### 2.4. Aroma vina

Pojam arome vina podrazumijeva impresiju mirisnih i okusnih komponenti. Aromu čine hlapljivi spojevi odgovorni za miris i nehlapljivi spojevi koji su odgovorni za okus (slatko,

slano, trpko). Najveći utjecaj na formiranje arome vina imaju sorta grožđa te tehnologija proizvodnje vina (Ugliano i sur., 2006). Postoje 4 vrste arome: primarna, sekundarna, aroma fermentacije i aroma starenja. Primarna aroma podrazumijeva terpenske spojeve u grožđu koji su nosioci sortne arome. Aroma ovisi o sorti, geoklimatskim uvjetima, zrelosti grožđa, utjecaju tla, sistema uzgoja, navodnjavanja, dodavanja gnojiva itd. Iz manje zrelog grožđa dobiva se vino koje sadrži više butanola, izoamilnog alkohola, feniletanola, ali puno manje etilnih estera, oktanske i dekanske kiseline čiji udio raste povećanjem udjela šećera. Sekundarna aroma razvija se tijekom obrade grožđa (runjenje, muljanje, prešanje). Ovdje se počinju razvijati kemijske i enzimatsko-biokemijske reakcije. Enzimatska aktivnost može biti odgovorna za nastanak metanola, aldehida i alkohola sa 6 ugljikovih atoma. Tako su heksenal, cis-3-heksenal, trans-2-heksenal i odgovarajući alkoholi odgovorni za biljni profil arome nekih vina. Nastaju djelovanjem enzima lipooksigenaze i alkohol dehidrogenaze uz prisustvo O<sub>2</sub> iz masnih kiselina. Ako se nekim enološkim postupkom ovaj enzimatski sustav inaktivira, sinteza ovih spojeva je ograničena. Iz ovoga je očito kako je moguće utjecati na aromu vina odabirući prikladne podrumske operacije prije fermentacije. Ovi postupci su važni kod bijelih vina koja su podložna nastajanju netipičnih aromatskih obilježja za određenu sortu. Bistrenje mošta također uvelike utječe na sekundarnu aromu. Zapaženo je da iz totalno izbistrenog mošta nastaje proizvod siromašan na hlapljivim spojevima, pogotovo na etilnim esterima. U primjereno izbistrenom moštu nastaje vino manje bogato višim alkoholima, ali puno bogatije acetatima i esterima u odnosu na neizbistreni mošt. Aroma fermentacije nastaje tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije kao proizvod metabolizma kvasca i bakterija. U ovom procesu nastaju viši alkoholi (kada ih ima manje od 300 mg L<sup>-1</sup> pozitivno utječu na aromu vina), masne kiseline, hlapljivi organski spojevi, aldehidi i ketoni. Aroma starenja se oblikuje tijekom dozrijevanja i skladištenja kroz enzimatske i fizikalne reakcije vina u drvu ili u boci (Boulton i sur., 1996). Dozrijevanje se odvija između 6 i 24 mjeseca te predstavlja vrijeme u proizvodnji vina između fermentacije i punjenja u boce. Za vrijeme dozrijevanja vina se mogu skladištiti u hrastovim bačvama i pretaču se nekoliko puta. Tijekom zrenja u bačvama dolazi do ekstrakcije fenolnih spojeva iz drva. Prilikom skladištenja u boci dolazi do konačnog sazrijevanja vina, a traje od pola godine do 50 i više godina. Promjene kemijskog sastava vina u bocama možemo razvrstati u 4 grupe:

1. Promjene u sastavu estera: tijekom prvih nekoliko godina udio acetata kontinuirano opada te se ovo odražava na opadanje svježine i voćnog tona vina. Količina etilestera masnih kiselina i drugih karboksilnih kiselina raste prilikom starenja.

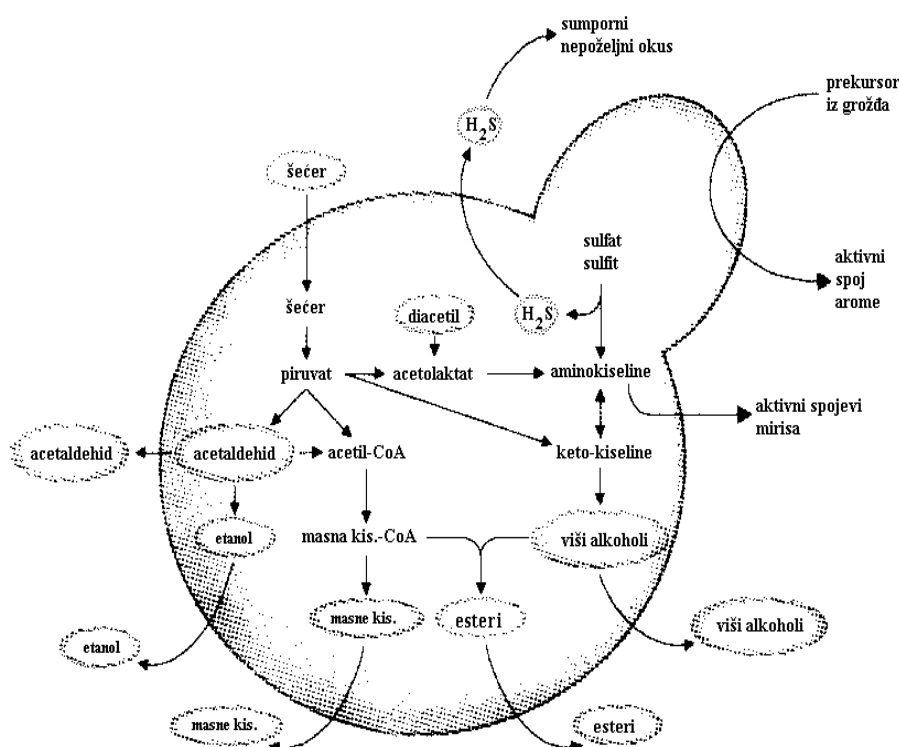
2. Formiranje spojeva uslijed razgradnje karotena: nastaju vitispiran, 1,1,6,3-metil-1,2-dihidronaftalen, damaskenon.
3. Formiranje spojeva uslijed razgradnje ugljikohidrata: raste koncentracija furfurala, acetilfurana, 2-etoksimetil-5-furfurala.
4. Kiselo katalizirane reakcije monoterpena: većina monoterpenskih alkohola oksidira u odgovarajuće terpen-okside tako da udio terpena opada starenjem vina.

Faktori koji utječu na starenje vina u bocama su: temperatura, kisik, sumporov dioksid, svjetlo, vlažnost, ventilacija. Povećanje temperature smanjuje trajnost vina, ali s druge strane niska temperatura (<10 °C) usporava proces starenja. Što se tiče kisika, istraživanja su pokazala da se bolji razvoj bouqueta i brže razvijanje boje postiže kada je vino zasićeno sa zrakom prije punjenja u boce. U slučaju propuštanja boca dobije se vino s lošijim okusom. Boce se skladište u ležećem položaju tako da je pluteni čep uvijek u tekućini kako bi se spriječio ulazak kisika u bocu. Sumporov dioksid utječe na razvoj vina u slučaju prodiranja određene količine kisika. Njime se sprječava prolazna oksidacija. Nadalje, boja stakla vinskih boca također utječe na starenje vina. Bijela vina stare brže u bijelim bocama nego u obojanim i time u kratkom periodu gube svoju svježinu i voćnu aromu. U slučaju da se bijela vina nalaze u obojanim bocama dolazi do redukcije bakrenih soli koju prati pojavljivanje preloma poznatog kao bakreni lom. U mnogim slučajevima boce se skladište u tamnim podrumima. Takvi uvjeti dopuštaju da se proces starenja odvija postepeno. Vlažnost je također jedan od važnijih faktora. Relativna vlažnost u podrumu mora biti >50 %. Podrumi se moraju prozračivati da bi se izbjegao neugodan miris na koji je vino osjetljivo. Aeracija je potrebna da bi se u podrumu održala stalna vlažnost.

Prekursori arome iz grožđa prešanjem prelaze u mošt, a to su glikozidni prekursori (najčešće terpenoidi) i spojevi s dušikom. U alkoholnoj fermentaciji dolazi do hidrolize glikozidno vezanih prekursora arome, čime se povećava aromatska kompleksnost vina. U vinu je primjećeno da se glikozidno vezani tercijarni alkoholi puno brže hidroliziraju u odnosu na primarne alkohole (Park i Noble, 1993). Što se tiče spojeva s dušikom, najznačajniji prekursori arome koji sudjeluju u sintezi hlapljivih spojeva tijekom alkoholne fermentacije vina su aminokiseline. One predstavljaju glavni izvor fermentabilnog dušika koji kvasci koriste za svoj rast. U moštu su najzastupljenije sljedeće aminokiseline: alanin, arginin, cistein, fenilalanin, glutamin, glutaminska kiselina, histidin, lizin, metionin, prolin i tirozin, ali najveći utjecaj na formiranje tvari arome imaju treonin, fenilalanin i aspartat (Torrea i Ancin, 1999). Spojevi koji

su odgovorni za voćne, sladne i slatkaste arome potječu iz razgranatih aminokiselinskih lanaca, dok cvjetne i kemijske arome potječu iz aromatskih aminokiselina (Jiranek i sur., 1995).

Etanol, glicerol i  $\text{CO}_2$  su glavni hlapljivi proizvodi metabolizma kvasca (Slika 3) te daju temeljni doprinos okusu vina. Fermentacijski bouquet tvore organske kiseline, viši alkoholi, esteri i aldehidi u manjoj mjeri (Lambrechts i Pretorius, 2000). Aldehidi, octena kiselina, etil-acetat, viši alkoholi i diacetil se u prekomjernim koncentracijama mogu smatrati nepoželjnima. Najnepoželjniji spojevi arome su reducirani spojevi sumpora, sumporovodik, organski sulfidi i tioli. Fermentacijski okus također nastaje i iz dugolančanih masnih kiselina, organskih kiselina koje sadrže dušik, spojeva koji sadrže sumpor i mnogih drugih. Ovi spojevi mogu iz mošta prodrijeti kroz staničnu membranu i ući u stanicu kvasca, gdje sudjeluju u biokemijskim reakcijama u kojima kao nusproizvodi nastaju brojne hlapljive tvari (Boulton i sur., 1996; Lambrechts i Pretorius, 2000).



**Slika 3.** Shematski prikaz nastajanja spojeva arome u kvascu (Lambrechts i Pretorius, 2000)

### 2.4.1. Viši alkoholi

Pojam viši alkoholi odnosi se na alkohole kojima je temperatura vrelišta viša od vrelišta etanola (78,35 °C), koji imaju više od dva ugljikova atoma i veću molekulsku masu. Mogu se prepoznati po svom snažnom, oštrom mirisu i okusu te mogu imati značajan utjecaj na okus i karakter vina (Nykänen, 1986). Njihova prisutnost u vinu kreće se u širokom rasponu, od 100 mg L<sup>-1</sup> do preko 500 mg L<sup>-1</sup>. Ako im je koncentracija manja od 300 mg L<sup>-1</sup> tada obično pridonose poželjnoj kompleksnosti vina, a ako koncentracija premašuje 400 mg L<sup>-1</sup> smatra se da viši alkoholi negativno utječu na vino (Rapp i Manderly, 1986; Henschke i Jiranek, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000). Viši alkoholi formiraju se metabolizmom kvasaca preko dva različita mehanizma:

1. anabolički put nastajanja viših alkohola iz ugljikohidrata polazi od piruvata i acetylCoA kao prekursora (MacDonald i sur., 1984).
2. katabolički put nastajanja iz aminokiselina prisutnih u mediju Ehrlichovim mehanizmom (transaminacija aminokiseline u  $\alpha$ -oksokiselinu, a nakon toga dekarboksilacija u odgovarajući aldehid i zatim redukcija u alkohol) (Rapp i Versini, 1991).

Na povećanje udjela viših alkohola tijekom alkoholne fermentacije utječu kvasčeva biomasa, oksidacija, povišena temperatura, prisutnost određenih tvari u suspenziji. Aminokiseline doprinose koncentraciji ukupnog dušika u podlozi, a količina viših alkohola nastalih anaboličkim putem ovisi u velikoj mjeri o koncentraciji dušika. Što je koncentracija dušika bliža limitirajućoj, to je veći prinos viših alkohola nastalih anaboličkim putem. Katabolička i anabolička sinteza viših alkohola mogu se smanjiti dodatkom dušika. Viši alkoholi sastoje se od alifatskih i aromatskih alkohola. Alifatski alkoholi su propanol, izobutil-alkohol, aktivni amil-alkohol i izoamil-alkohol. Izoamil-alkohol je glavni alifatski viši alkohol kojeg kvasac sintetizira tijekom fermentacije. Ovisno o prirodi pića, on čini 40-70 % ukupnih viših alkohola. Među aromatskim alkoholima najvažniji je fenetil-alkohol, a drugi važan fenolni alkohol u vinu je tirozol, koji je blagog mirisa, nalik na pčelinji vosak, odnosno na med. Uvjeti uzgoja loze i upotreba različitih kvasaca doprinose značajnim varijacijama količine viših alkohola. Viši alkoholi također su važni prekursori nastajanja estera, a esteri viših alkohola povezani su s ugodnim aromama (Nykänen, 1986; Giudici i sur., 1990; Lambrechts i Pretorius, 2000). U Tablici 1 navedeni su neki viši alkoholi i pripadajući mirisi vina.

**Tablica 1.** Neki viši alkoholi koje proizvodi kvasac, njihove koncentracije, pragovi osjetljivosti i pripadajući mirisi vina (Nykänen, 1986; Giudici i sur., 1990; Lambrechts i Pretorius, 2000)

Viši alkohol	Aminokiselina iz koje nastaje	Koncentracija u vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Prag osjetljivosti [mg L <sup>-1</sup> ]	Miris
propanol	treonin /2-aminomaslačna kiselina	9 – 68 125	500 <sup>†</sup> 800 <sup>‡</sup>	omamljujući
butanol	-	0,5 - 8,5	-	miris karakterističan za više alkohole
izobutil-alkohol	valin	9 - 28 (100) 140	500 <sup>†</sup> 75,0 <sup>*</sup> 200 <sup>‡</sup>	alkoholni
aktivni amil-alkohol	izoleucin	15 - 150	65 <sup>‡</sup>	marcipan
izoamil-alkohol	leucin	45 - 490	300 <sup>†</sup> 7,0 <sup>*</sup> 70 <sup>‡</sup>	marcipan
heksanol	-	0,3 - 12	5,2 <sup>*</sup> 4 <sup>‡</sup>	-
tirozol	tirozin	-	-	pčelinji vosak, nalik na med
triptofol	triptofan	-	-	-
fenetil-alkohol	fenilalanin	10 - 80	7,5 <sup>*</sup> 125 <sup>‡</sup>	cvjetni, nalik na ružu

\*Koncentracije određene u više od 50 % otopina alkoholnih pića, podrijetlom iz žitnih sirovina, s masenim udjelom etanola od 9,4 %.

<sup>†</sup> u vinu

<sup>‡</sup> u pivu

- nisu navedeni podaci

#### 2.4.1.1. Utjecaj soja kvasca na proizvodnju viših alkohola

Proizvodnja viših alkohola je individualno svojstvo soja. Različite vrste kvasaca proizvode različite količine viših alkohola, a najuočljivije su razlike u slučaju 1-propanola. Proizvodnja različitih količina viših alkohola bitna je značajka pri selekciji vinskih kvasaca

(Lambrechts i Pretorius, 2000). Herraiz i suradnici (1990) utvrdili su da je rast kvasaca vrsta *Koeckera apiculata* i *Torulaspora delbrueckii* prouzročio značajne razlike u sastavu hlapljivih tvari u odnosu na vina čija je fermentacija provedena sa čistom kulturom kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Uočeno je da su omjeri izoamil-alkohola i aktivnog amil-alkohola te izobutanola i 1-propanola karakteristični za svaki kvasac. Aeracijom mošta povećava se nastajanje viših alkohola, osobito izobutil-alkohola. U oksidativnim uvjetima kvasci s ograničenim fermentacijskim sposobnostima (*Pichia sp.*, *H.anomala* i *Candida sp.*) proizvode značajne koncentracije viših alkohola. Istraživanje koje su proveli Mauricio i suradnici (1997) pokazuje da etanol, izoamil-alkohol, izobutil-alkohol, fenetil-alkohol, izoamil-acetat, butil-acetat i heksil-acetat nastaju u većim koncentracijama u semiaerobnim uvjetima, a nastajanje 1-butanola i 1-pentanola je s većim koncentracijama povezano s anaerobnim uvjetima. Također je uočeno da kriotolerantni kvasci vrste *Saccharomyces uvarum* proizvode 4 puta više fenetil-alkohola (miris po ružama) od mezofilnih kvasaca iz roda *Saccharomyces*.

#### 2.4.2. Esteri

Ova skupina hlapljivih spojeva najviše utječe na osjet ugodnog mirisa (Tablica 2). Svježa voćna aroma mladih vina potječe velikim dijelom od prisutnosti smjese estera proizvedenih tijekom fermentacije. Esteri se sintetiziraju iz viših alkohola ili kratkolančanih masnih kiselina. Esteri nastali iz ravnolančanih masnih kiselina (etil propionat, etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanoat) poznati su kao voćni esteri i oni čine brojčano najveću skupinu tvari arome koje sintetizira kvasac (Lambrechts i Pretorius, 2000). Drugu skupinu estera prisutnih u vinu čine acetatni esteri (etil acetat i izoamil acetat – miris na bananu) koji su odgovorni za poželjan voćni karakter mladih vina proizvedenih iz neutralnih sorata grožđa (Wang i sur., 2002, Plata i sur., 2003). Najzastupljeniji acetatni ester u vinu je etil acetat. On u koncentracijama ispod 60 mg L<sup>-1</sup> pogoduje i poboljšava profil arome vina. Nepoželjni udjeli etil acetata u bijelom vinu iznose 170 mg L<sup>-1</sup> (miris po octu) (Torrea i sur., 2002). Reakcija sinteze estera odvija se po Nordström (1964) u 2 stupnja iz alkohola i masne kiseline:

1.  $\text{RCOOM} + \text{ATP} + \text{CoASH} \rightarrow \text{R}'\text{CO-SCoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$
2.  $\text{R}'\text{CO-SCoA} + \text{R}'\text{OH} \rightarrow \text{RCOOR}' + \text{CoASH}$

Na proizvodnju estera djelovanjem kvasca tijekom alkoholne fermentacije utječu zrelost i sorta grožđa, udio šećera, pH mošta, netopljive tvari u moštu, soj kvasca, temperatura fermentacije i metode vinifikacije (Bueno i sur., 2006). Konačna koncentracija nekog estera u vinu ovisna je o intenzitetu njegova nastajanja, kemijskim reakcijama kojima on podliježe

tijekom fermentacije te procesu dozrijevanja i razdiobi između vina i kvasca (Lambrechts i Pretorius, 2000).

**Tablica 2.** Neki esteri koje proizvodi kvasac, njihove koncentracije, prag osjetljivosti i pripadajući mirisi (Lambrechts i Pretorius, 2000)

Esteri	Koncentracija u vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Prag osjetljivosti [mg L <sup>-1</sup> ]	Miris
etil-acetat	-	17,62* 12,3	po laku za nokte, voćni
izoamil-acetat	0,03 - 8,1	0,26*	po banani, kruški
2-fenetil-acetat	0,01 - 4,5	-	po ruži, medu, voćni, cvjetni
etil-izovalerat	nema podataka - 0,7	-	po jabuci, voćni
izobutil-acetat	0,01 - 0,8	-	po banani
etil-butanoat	0,01 - 1,8 0,01 - 3	0,4 (pivo)	cvjetni, voćni
etil-2-metilbutanoat	nema podataka – 0,9	-	po jagodi, ananasu
heksil-acetat	-	-	-
etil-heksanoat	tragovi – 3,4	0,08	po jabuci, banani, ljubičici
etil-oktanoat	0,05 - 3,8	0,58 0,258*	po ananasu, kruški
etil-dekanoat	tragovi - 2,1	0,5	cvjetni

\*Koncentracije određene u više od 50 % otopina alkoholnih pića, podrijetlom iz žitnih sirovina, s masenim udjelom etanola od 9,4 %.

- nisu navedeni podaci

#### 2.4.2.1. Utjecaj soja kvasca na nastajanje estera

Vrste kvasaca *Hansenula anomala* i *Candida crusei* proizvode više etil acetata od vrsta kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Pichia membranaefaciens*. S druge strane, vrste *Hansenula anomala* i *Candida crusei* proizveli su najniže količine etilnih estera oktan-kiseline, dekan-kiseline i laurinske kiseline. Nadalje, *Pichia fermentans* proizvodi veće količine etil-acetata od dva soja kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae* s uobičajenom



proizvodnjom etil-acetata (Lambrechts i Pretorius, 2000). Suomalainen i Lehtonen (1979) utvrdili su da vrsta *Saccharomyces cerevisiae* proizvodi značajno više izoamil-acetata, etil-kaproata, etil-kaprilata i etil-kaprata nego vrsta *Saccharomyces uvarum*. Prisutnost kvasca iz roda *Rhodothorula* povećava nastajanje izoamil-acetata, a kvasci vrste *Hansenula anomala* i *Candida crusei* proizvode manje estera od kvasca vrste *Schizosaccharomyces pombe*.

### 2.4.3. Karbonilni spojevi

#### 2.4.3.1 Aldehidi i ketoni

Aldehidi ovisno o kemijskoj strukturi daju različite okuse, od okusa nalik na jabuku do okusa nalik na citrus i orah (Tablica 3). Nastaju u kvaščevoj stanici, a zatim prelaze u njenu okolinu. Glavni aldehyd pronađen u vinu je etanal ili acetaldehyd. U bijelim vinima udjel acetaldehyda pokazatelj je stupnja oksidiranosti vina pri čemu nastaju blage arome po bademu. Oksidiranost uzrokuje pomanjkanje svježine vina (Robinson, 1999). Što se tiče ketona, važan sastojak arome je diacetil ili 2,3-butandiol. Nastaje tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije, a koncentracija mu se kreće od 0,05 do 4,1 mg L<sup>-1</sup>. Ukoliko koncentracija premaši 5 mg L<sup>-1</sup> tada je nepoželjan u vinu i stvara neugodne mirise. Daje aromu po maslacu. Najveći udio diacetila u vinu nastaje djelovanjem bakterija mliječne kiseline tijekom jabučno-mliječne fermentacije (Bratowsky i Henschke, 2004).

2-oksokiseline su prekursori aldehyda, a nastaju kao intermedijeri u anaboličkom i kataboličkom putu nastajanja aminokiselina i viših alkohola. Aldehydi se mogu izlučivati iz kvasca, ali i reducirati u stanici u odgovarajuće alkohole tijekom kasnijih faza fermentacije. Acetaldehyd je intermedijarni proizvod koji nastaje iz piruvata kao prekursor acetata, acetoina i etanola. Količina acetaldehyda prisutnog u vinima povećava se tijekom dozrijevanja zbog oksidacije etanola, aktivnosti površinskih kvasaca ili aeracije. Diacetil nastaje oksidativnom dekarboksilacijom  $\alpha$ -okso-acetolaktata (Boulton i sur., 1996; Lambrechts i Pretorius, 2000). Konačna koncentracija diacetila u vinu određena je ravnotežom između brzine njegova nastajanja i brzine razgradnje. U kasnijim fazama fermentacije, diacetil se može metabolizirati djelovanjem kvasca u acetoin i 2,3-butan-dion (Lambrechts i Pretorius, 2000).

**Tablica 3.** Neki karbonilni spojevi koje proizvode kvasci, njihove koncentracije, vrijednosti praga osjetljivosti i pripadajući miris (Lambrechts i Pretorius, 2000)

Karbonilni spoj	Koncentracija u vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Prag osjetljivosti [mg L <sup>-1</sup> ]	Miris
acetaldehid	10 - 300	100	po kiselim, zelenim jabukama
benzaldehid	$0,3 \times 10^2$ - 4,1	-	po gorkom bademu
butanal	tragovi	-	oštar
diacetil	0,05 – 5	0,15 <sup>†</sup> 2,5 <sup>*</sup>	po maslacu
propanal	tragovi	-	sličan acetaldehidu
izobutanal	tragovi	-	malo nalik na jabuku
pentanal	tragovi	-	nalik na kakao i kavu, malo nalik na voće, u većim koncentracijama izaziva osjećaj gušenja
izovaleraldehid	tragovi	-	topao, biljni, nalik na voće, nalik na orahe, trpak pri višim koncentracijama
2-acetiltetrahidropiridin	tragovi	$1,6 \times 10^3$	po mišjem urinu ili acetamidu

<sup>†</sup> pivo

\* vrijednosti iznad kojih se javlja nepoželjan okus

- nisu navedeni podaci

#### 2.4.3.1.2. Utjecaj soja kvasca na koncentraciju aldehida

Sojevi kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae* proizvode relativno velike koncentracije (od 50 do 120 mg L<sup>-1</sup>), dok drugi vinski kvasci, poput vrsta *Kloeckera apiculata*, *Candida crusei*, *Candida stellata*, *Hansenula anomala* i *Metchnikowia pulcherima*, proizvode niske koncentracije aldehida (od najmanjih koncentracija koje se ne mogu ustanoviti do 40 mg L<sup>-1</sup>) (Fleet i Heard, 1993). Uočeno je da se kvasci s niskom i srednjom proizvodnjom acetaldehida međusobno značajno razlikuju po proizvodnji octene kiseline, acetoina i viših alkohola. Vina dobivena uz pomoć kvasaca koji proizvode niske koncentracije acetaldehida sadržavala su tragove acetoina, manje količine octene kiseline (<500 mg L<sup>-1</sup>) i višu koncentraciju ukupnih viših alkohola (>300 mg L<sup>-1</sup>), dok su vina proizvedena sa sojevima koji proizvode velike koncentracije acetaldehida pokazala različita svojstva, te su sadržavala mjerljive količine acetoina, veće količine octene kiseline (528-1185 mg L<sup>-1</sup>) i manje koncentracije viših alkohola (256-270 mg L<sup>-1</sup>) (Lambrechts i Pretorius, 2000).

#### 2.4.4. Hlapljivi fenoli

Hlapljivi fenoli koji se nalaze u vinu rezultat su metabolizma kvasca, bakterija ili hidrolize viših fenola. U bijelim vinima najvažniji su vinilfenoli (4-vinilgvajakol i 4-vinilfenol). Pojavljuju se u koncentracijama od 0 do 6047 µg L<sup>-1</sup>, a ukoliko su prisutni u koncentracijama iznad 6047 µg L<sup>-1</sup> tada uzrokuju neželjene mirise opisane kao životinjski, medicinski, stajski, miris plastike i miris konjskog znoja (Tablica 4). Derivati 4-vinilgvajakola mogu dati vinu notu vanilije i klinčića, a prisutnost 4-vinilfenola je uvijek nepoželjna budući da prikriva voćne nijanse arome bijelih vina (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Prekursori vinilfenola su trans-ferulinska kiselina i trans-kumarinska kiselina (nehlapljivi su, nemaju miris i prisutni su u svim vinima). Sinteza vinifenola odvija se neoksidativnom dekarboksilacijom fenolnih kiselina. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* dekarboksilira samo cimetnu kiselinu u hlapljive fenole, a među cimetnim kiselinama koje su prisutne u grožđu, samo ferulinska i p-kumarinska kiselina mogu se prevesti u 4-vinilfenol (Ribèreau-Gayon i sur., 2006).

**Tablica 4.** Neki vinilfenoli koje proizvodi kvasac, njihove koncentracije, vrijednosti praga osjetljivosti i pripadajući mirisi vina (Lambrechts i Pretorius, 2000)

Fenolni spoj	Koncentracija u vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Prag osjetljivosti u bijelom vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Prag osjetljivosti u crnom vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Miris
4-vinilfenol	0 - 1150	770	-	farmaceutski, po plastičnim masama, gouache
4-vinilgvajakol	0 - 496	440	-	dimni, po vaniliji, klinčiću
4-vinilgvajakol + 4-vinilfenol (1:1)	-	752	-	-

- nisu navedeni podaci

#### 2.4.5. Hlapljive masne kiseline

Kiselost mošta direktno utječe na senzorsku kvalitetu te fizikalnu, biokemijsku i mikrobiološku stabilnost vina. U vinu su prisutne uglavnom zasićene masne kiseline, a palmitoleinska kiselina se smatra jedinom važnom nezasićenom kiselinom (Lambrechts i Pretorius, 2000). Udio hlapljivih kiselina se kreće između 500-1000 mg L<sup>-1</sup>, a preko njih 90% čini octena kiselina (Henschke i Jiranek, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000). Optimalne koncentracije octene kiseline kreću se između 0,2-0,7 g L<sup>-1</sup>, inače postaje neugodna. Koncentracija octene kiseline je zakonski regulirana i ne smije biti veća od 1,0-1,5 g L<sup>-1</sup>. Acetat nastaje djelovanjem bakterija octene i mliječne kiseline i kao nusproizvod djelovanjem alkoholne fermentacije. U vinu su prisutne i male količine drugih masnih kiselina, npr. propionska, mravlja i maslačna. Kvasac uglavnom proizvodi hlapljive masne kiseline s lancem srednje dužine (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>) (Tablica 5). Te masne kiseline mogu djelovati kao mogući inhibitori alkoholne fermentacije. Njihova sposobnost inhibicije rasta kvasca izravno je proporcionalna njihovoj topljivosti. Što se tiče nehlapljivih masnih kiselina dominantne su vinska i jabučna. U moštu su prisutne i limunska i mliječna kiselina, a u grožđu jantarna i ketokiseline (Lambrechts i Pretorius, 2000; Ribèreau-Gayon i sur., 2006).

**Tablica 5.** Neke hlapljive masne kiseline koje proizvodi kvasac, koncentracije praga osjetljivosti i pripadajući mirisi u vinu (Lambrechts i Pretorius, 2000)

Hlapljiva masna kiselina	Koncentracija u vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Prag osjetljivosti [mg L <sup>-1</sup> ]	Pripadajući miris
mravlja kiselina	50	-	-
octena kiselina	150 - 900	700 – 1000 100 – 125 400	po octu, prodoran
propionska kiselina	tragovi	20,0*	užegao, lagano prodoran
maslačna kiselina	tragovi	2,2 / 4,0*	prodoran
izomaslačna kiselina	tragovi	8,1*	prodoran, manje od maslačne kiseline
valerijanska kiselina	tragovi	-	neugodan
izovalerijanska kiselina	< 3	0,7*	užegao, po siru, znoju, s vremena na vrijeme po truleži, smrdljiv
2-metilmaslačna kiselina	-	-	-
heksan-kiselina	tragovi – 37	8 8,8*	kiseo, po octu, siru, znoju, užegao, mastan, oštar
heptan-kiselina	tragovi	-	-
oktan-kiselina	tragovi – 41	13 15*	uljast, mastan, užegao, sapunast, sladak, po voću, maslacu
nonan-kiselina	-	-	-
dekan-kiselina	tragovi – 54	10 8,2*	mastan, neugodan, užegao, po citrusima, fenolni
tridekan-kiselina	15 - 118	-	mastan, po citrusima, neugodan

\*Koncentracije određene u više od 50 % otopina alkoholnih pića, podrijetlom iz žitnih sirovina, s masenim udjelom etanola od 9,4 %.

- nisu navedeni podaci

Koncentracija masnih kiselina varira ovisno o tehnološkim postupcima primijenjenim pri obradi mošta. Bistrenje vina drastično smanjuje koncentraciju masnih kiselina i može uzrokovati zastoj fermentacije. Kvasci sintetiziraju uglavnom iste masne kiseline, ali je sastav masnih kiselina vrlo promjenjiv. Na sastav utječu male promjene uvjeta rasta (pH, temperatura, otopljeni kisik, prisutnost ili odsutnost hranjivih tvari) i brzina rasta samog organizma (Lambrechts i Pretorius, 2000).

#### 2.4.5.1. Utjecaj soja kvasca na proizvodnju hlapljivih masnih kiselina

Utvrđeno je da *Saccharomyces uvarum* proizvodi vrlo male koncentracije octene kiseline te da je također proizveo najniže koncentracije hlapljivih kiselina (oko 0,1 g L<sup>-1</sup>). *Saccharomyces cerevisiae* proizvodi 0,3-1,2 g L<sup>-1</sup> octene kiseline, *Kloeckera apiculata* 1-2,5 g L<sup>-1</sup>, *Candida stellata* 1-1,3 g L<sup>-1</sup>, *Metschnikowia pulcherrima* 0,1-0,15 g L<sup>-1</sup>, *Candida krusei* 1 g L<sup>-1</sup>, a *Hansenula anomala* 1-2 g L<sup>-1</sup> (Fleet i Heard, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000). Herraiz i suradnici (1990) objavili su da kvasac *Saccharomyces cerevisiae* proizvodi velike količine kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline, a kvasci *Torulaspora delbrueckii* i *Kloeckera apiculata* ih proizvode u manjim koncentracijama. Ipak, kvasac *Kloeckera apiculata* proizvodi značajne količine laurinske, miristinske, palmitinske i palmitoleinske kiseline.

#### 2.4.6. Sumporovi spojevi

Sumporovi spojevi značajno pridonose okusu vina zbog svoje ekstremno niske vrijednosti praga osjetljivosti (ispod 0,002 ppb). U Tablici 6 prikazani su neki od sumporovih spojeva koji se mogu naći u vinu. Detaljno istraživan spoj je sumporovodik zbog njegove često zamjećene arome tijekom fermentacije. Sumporovodik ima nizak prag osjetljivosti (10-100 µg L<sup>-1</sup>), a koncentracije iznad ovih vrijednosti uzrokuju miris po trulim jajima. Međutim koncentracija 20-30 µg L<sup>-1</sup> ovog spoja može imati pozitivan doprinos okusu po kvascu (Henschke i Jiranek, 1993; Rauhut, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000). Tijekom fermentacije pri višim temperaturama i pri višim pH vrijednostima može doći do povećane proizvodnje sumporovodika.

**Tablica 6.** Neki sumporovi spojevi koje proizvodi kvasac, njihove koncentracije, vrijednosti praga osjetljivosti, i pripadajući mirisi vina (Rauhut, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000)

Sumporovi spojevi	Koncentracija u vinu [mg L <sup>-1</sup> ]	Prag osjetljivosti [µg L <sup>-1</sup> ]	Pripadajući miris
sumporovodik	tragovi - >80	50-80	na trula jaja
dimetil-sulfid	tragovi – 910	25-60	na šparoge, kukuruz, melasu
dietil-sulfid	tragovi	0,92	na kuhano povrće, luk, češnjak
dimetil-disulfid	tragovi – 1,6	29	na kuhani kupus, luk
metil-merkaptan	kvalitativno određena	2-12	na trula jaja, kupus
etil-merkaptan	kvalitativno određena	1,1	na luk, gumu
S-metiltioacetat	2 - 16	300	na trulo povrće
S-etiltioacetat	tragovi-4	40	po siru, paleži
4-merkaptan-4-metilpentan-2-ol	tragovi	$3 \times 10^{-6}$	na šimšir, mačji urin, guavu, četinjače

#### 2.4.6.1. Utjecaj soja kvasca na nastajanje sumporovih spojeva arome

Neki sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* proizvode veće količine sumporovodika, pa njegova koncentracija u vinu može biti iznad 1 mg L<sup>-1</sup>. Neki sojevi mogu biti odgovorni za nepoželjan miris i okus vina, a drugi izazivaju neznatno povećanje sumporovih spojeva koji ne uzrokuju nepoželjan okus vina (Herraiz, 1990, Rauhut, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000).

#### **2.4.7. Terpeni**

Terpenski spojevi ne sudjeluju u metabolizmu kvasca tijekom fermentacije. Oni uglavnom potječu iz grožđa (u bobici se nalaze u pokožici i mesu) te su interesantni zbog svog jedinstvenog cvjetnog karaktera. Najviše su zastupljeni geraniol i linalol (miris po ruži) i nerol (miris po biljkama). Osnovna kemijska struktura terpena je izopren, a najjednostavniji terpeni su monoterpeni sa 10 ugljikovih atoma. Monoterpeni u grožđu postoje u dva oblika: slobodni i glikozidno vezani. Glikozidno vezani monoterpeni akumuliraju se u bobici grožđa u većoj količini od slobodnih monoterpena. Saznanje o distribuciji slobodnih i glikozidno vezanih terpena u bobici grožđa daje vinarima informaciju o tome na koji način voditi proces proizvodnje vina da se dobije optimalna koncentracija ovih spojeva u vinu (Rapp i Mandery, 1986; Esti i Tamborra, 2006). Čimbenici koji utječu na udio ovih spojeva u grožđu su: zrelost i sorta grožđa, izloženost bobica sunčevom svjetlu, upotreba glikozidaza, prešanje i starenje vina (Park i Noble, 1993).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. METODE

Sve metode koje su korištene pri kemijskoj analizi vina su iz Tehnologije vina (Daničić, 1988).

#### 3.1.1. Određivanje koncentracije šećera RS metodom

##### Postupak:

Vino: Uzima se 5 mL originalnog uzorka i razrjeđuje se s 20 mL destilirane vode. Doda se 10 mL otopine A (Fehling 1) i 10 mL otopine B (Fehling II). Kuha se točno 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 mL uz povratno hladilo, zatim se ohladi pod vodom i doda 10 mL otopine C (30 %-tni KI) i 10 mL otopine D (26 %-tne  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Sve se dobro izmiješa i doda 2 mL škroba (1 %-tna otopina) te titrira s 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  do prelaza tamno smeđe boje u boju puti koja se treba zadržati 1 minutu.

GLUKOZA TEST (kontrola): uzme se 5 mL 1 %-tne glukoze i 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) i ponovi gore opisani postupak.

SLIJEPA PROBA: uzme se 25 mL destilirane vode i ponovi gore opisani postupak.

##### IZRAČUNAVANJE KONCENTRACIJE ŠEĆERA:

$$\text{RS} = 50 \times (a-b)/(a-c) \times d$$

RS = reducirajuće supstance (g/L)

a = mL 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utrošeni za slijepu probu

b = mL 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utrošeni za uzorak

c = mL 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utrošeni za kontrolu (glukoza test)

d = mL uzorka uzeti za analizu

### **3.1.2. Određivanje ukupnih kiselina u vinu**

#### Princip određivanja ukupnih kiselina:

Sve slobodne organske i anorganske kiseline i njihove kisele soli te druge kisele tvari neutraliziraju se otopinom natrijevog hidroksida, iz čijeg se utroška računa količina ukupnih kiselina. Ukupna kiselost izražava se kao vinska kiselina u  $\text{g L}^{-1}$ .

Kako se natrijev hidroksid troši na neutralizaciju svih spomenutih kiselina, količina ukupnih kiselina mora se izraziti u jednoj od kiselina koje se nalaze u moštu. Obzirom da je u moštu najvažnija vinska kiselina, u većini zemalja se preko nje izražava količina ukupnih kiselina. U nekim zemljama, npr. Francuskoj, ukupne kiseline izražavaju se kao sumporna.

#### Postupak:

Prije analize potrebno je baždariti pH metar. Nakon toga trbušastom pipetom uzeti 25 mL vina i staviti u čašu od 100 mL te odrediti pH.

Vino se zagrije do vrenja da se ukloni  $\text{CO}_2$ , a zatim se dobro ohladi i pristupi titraciji s 0,1 M NaOH uz pH – metar. NaOH se dodaje sve do pH 7.

$$y = V \times 0,3 \times f$$

$\gamma$  = masena koncentracija ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina [ $\text{g L}^{-1}$ ]

V = volumen otopine natrij hidroksida koncentracije 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  [mL]

f = faktor otopine natrij hidroksida koncentracije 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  ( $f = 1,0000$ )

1 mL NaOH koncentracije 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  odgovara 0,3  $\text{g L}^{-1}$  vinske kiseline.

### **3.1.3. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku**

#### Princip određivanja hlapljivih kiselina:

Hlapljive kiseline određuju se tako da se destilacijom vina prevode u destilat, a zatim neutraliziraju otopinom natrijevog hidroksida, na temelju čijeg utroška se izračuna količina hlapljivih kiselina. Octena kiselina isparava teže od alkohola i vode pa se destilacija provodi u struji vodene pare, čime se omogućava da cjelokupna količina octene kiseline pređe u destilat.

**Postupak:**

Za određivanje hlapljivih kiselina uzima se trbušastom pipetom 5 mL uzorka, stavi se u tikvicu kruškastog oblika i doda se 1 mL 25 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Pri tome treba paziti da površina vode u Erlenmayer tikvici za proizvodnju pare bude uvijek iznad nivoa tekućine u kruškastoj tikvici. Za vrenje vode u Erlenmayer tikvici treba ubaciti nekoliko komadića porozne gline ili staklene kuglice. Od probe treba predestilirati 60 mL, a dobiveni destilat zagrijati do početka vrenja i titrirati uz fenolftalein s 0,1 M natrij hidroksidom.

Izračunavanje:

$$y = V \times 1,2$$

$y$  = masena koncentracija hlapljivih kiselina, izraženih kao octena kiselina [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$V$  = volumen otopine natrij hidroksida koncentracije 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  [mL]

1 mL NaOH koncentracije 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  odgovara 1,2 g  $\text{L}^{-1}$  octene kiseline.

**3.1.4. Određivanje sumporovog dioksida****Određivanje slobodnog sumpora (20 min bez grijanja)**

U tikvicu za kuhanje otpipetira se preko lijevka 10 mL vina koje analiziramo i 5 mL fosforne kiseline ( $w = 25\%$ ). U manju, apsorpcionu tikvicu treba dodati već pripremljeni reagens tako da nivo bude do proširenog grla apsorpcijske tikvice. Obavezno otvoriti vodu koja struji kroz hladilo te vodu u vakuum sisaljci do pojave mjehurića u menzuri na jednoj strani i u tikvicama aparature. Nakon 20 minuta skinuti tikvicu s reagensom i titrirati s 0,01 M NaOH. Utrošene mL 0,01 M NaOH treba pomnožiti s 32 da bi se dobili mg slobodnog  $\text{SO}_2$  u 1 litri vina.

**Određivanje vezanog sumpornog dioksida**

Vino koje je nakon određivanja slobodnog sumpora ostalo u tikvici za kuhanje ostaje i dalje u toj tikvici. Mijenja se reagens u maloj apsorpcionoj tikvici, a zatim se pod tikvicu za kuhanje stavi plamenik sa što manjim plamenom, pa se grije se uz lagano vrenje točno 10 minuta. Utrošene mL 0,01 M NaOH pomnožimo s 32 i dobijemo mg vezanog  $\text{SO}_2$  u 1 litri vina.

### Određivanje ukupnog sumpora

Ukupni  $\text{SO}_2$  dobije se zbrajanjem vrijednosti slobodnog i vezanog  $\text{SO}_2$ .

#### Priprema indikatora u otopini $\text{H}_2\text{O}_2$ :

U 100 mL destilirane vode dodati 2 mL vodikovog peroksida i indikatora po potrebi do prljavo sivoplave boje (2-3 mL).

INDIKATOR: Smjesa otopine A i B (100 mL A + 15 mL B)

OTOPINA A: 0,03 g metilnog crvenila u 100 mL 96 % alkohola

OTOPINA B: 0,1 g metilnog plavila u 100 mL destilirane vode

### **3.1.5. Određivanje alkohola kemijskom metodom**

#### Postupak:

Vino se razrijedi u odnosu 1:10, tako da se u odmjernu tikvicu od 50 mL stavi 5 mL vina i dopuni destiliranom vodom do oznake. U postupak se uzima 5 mL ovako razrijeđenog vina koje se stavi u tikvicu za destilaciju od 50 mL, doda još 5-6 mL destilirane vode i sadržaj neutralizira s 0,1 M NaOH uz univerzalni indikator. U Erlenmayerovu tikvicu od 100 mL, u koju će se hvatati destilat, stavi se točno 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 mL koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmayerovu tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija treba biti polagana i postepena i traje dok se sadržaj u tikvici za destilaciju ne smanji na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije lula se ispere iznutra s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmayerovu tikvicu u koju se hvatao destilat. Sadržaj Erlenmayerove tikvice se promućka, začepi gumenim čepom i ostavi stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola.

Tijekom oksidacije alkohola utroši se jedan dio bikromata, dok drugi ostane u suvišku. Zatim se sadržaj kvantitativno prebaci u Erlenmayerovu tikvicu od 500 mL (isperemo tikvicu), doda se oko 200 mL destilirane vode radi razrijeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavi začepljeno 5 minuta. Tada dolazi do oksido-redukcijskog procesa preostalog kalijevog bikromata i KI: krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod iz KI se oksidira u elementarni jod, zbog čega otopina dobije tamniju boju. Pritom se elementarni jod oslobađa u količini ekvivalentnoj kalijevom bikromatu. Titrira se 0,1

M otopinom natrijevog tiosulfata, pri čemu dolazi do oksidoredukcije između joda i natrijevog tiosulfata, u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Kad boja postane svijetlija doda se 5 mL 1%-tne otopine škroba i titracija nastavi do pojave tirkizno-zelene boje. Prijelaz boje je vrlo jasan i nastaje čim nestanu posljednje količine joda.

### **IZRAČUNAVANJE KOLIČINE ALKOHOLA:**

$$\text{Alkohol (vol \%)} = (10 - a/6,9) \times 2$$

a = utrošak 0,1 M otopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

### **3.1.6. Određivanje alkohola denzimetrijski**

#### Princip:

Količina alkohola u vinu odredi se pomoću piknometra, na osnovi specifične težine destilata. To je tzv. denzimetrijska metoda.

#### **1. Određivanje specifične težine vina**

Piknometar se ispere 2-3 puta s malo vina koje se ispituje. Pomoću specijalnog lijevka napuni se tako da nivo bude iznad oznake na grliću. Temperira se u vodenoj kupelji pri 20 °C / 20 minuta, a zatim se višak vina iznad oznake odstrani pomoću filter papira. Piknometar se dobro obriše i važe da bi se dobila masa pinometra s vinom. Specifična težina vina odredi se na sljedeći način:

$$\gamma = (A - B) / C$$

A - masa piknometra s vinom (destilatom ili ostatkom od destilacije)

B - masa praznog piknometra

C - vodena vrijednost piknometra

Vrijednosti B i C potrebne za računanje određene su ranije za svaki pojedini piknometar.

#### **2. Određivanje količine alkohola u vinu**

Nakon određivanja specifične težine, vino se iz piknometra prenese u tikvicu za destilaciju od 250 mL. Važno je pritom isprati piknometar 2-3 puta s nekoliko mililitara hladne destilirane vode i to sve prelići u tikvicu za destilaciju. Prilikom destilacije, destilat se hvata u isti piknometar preko specijalnog lijevka, koji služi za punjenje piknometra. U piknometar se ulije

malo destilirane vode tako da je vrh lijevka uronjen u nju. Destilacija traje dok se piknometar ne napuni destilatom do  $\frac{3}{4}$  njegovog volumena. Tada se piknometar napuni destiliranom vodom do ispod oznake i stavi u vodenu kupelj na 20°C/20 minuta, a zatim nadopuni do oznake destiliranom vodom, obriše i važe. Specifična težina destilata izračunava se kao pod 1.

Specifična težina destilata je uvijek manja od specifične težine vina i to utoliko manja ukoliko ima više alkohola.

Na osnovi specifične težine destilata iz tablice (po Windischu) očita se količina alkohola u g/L vina, a iz ove vrijednosti volumni postoci etanola.

### **3.1.7. Enzimsko određivanje glicerola**

#### Princip:

Glicerol se fosforilira pomoću adenzin-5'-trifosfata (ATP) u L-glicerol-3-fosfat reakcijom koju katalizira glicerokinaza. Adenzin-5'-difosfat (ADP) koji nastaje u reakciji ponovo se konvertira u ATP uz nastajanje piruvata. U reakciji s ADP još sudjeluje fosfoenolpiruvat (PEP), a katalizirana je enzimom piruvat kinaza (PK). Djelovanjem enzima L-laktat dehidrogenaze (L-LDH), piruvat se reducira u L-laktat pomoću reduciranog nikotinamid-adenin dinucleotida (NADH) uz nastajanje NAD<sup>+</sup>.

Pri 340 nm mjeri se smanjenje apsorbancije zbog potrošnje NADH. Nastali NAD<sup>+</sup> je u stehiometrijskom odnosu s količinom glicerola u uzorku.

Ova je metoda specifična za glicerol. Linearna je u rasponu 0,8-35 µg glicerola u uzorku. Pri provođenju analize dopuštene su razlike apsorbancije dvaju istovjetnih uzoraka koje iznose 0,005-0,010, što odgovara koncentraciji glicerola od otprilike 0,086-0,171 mg L<sup>-1</sup> u analiziranom uzorku. Ukoliko su uzorci razrijeđeni, koncentracija dobivena analizom razrijeđenog uzorka množi se faktorom razrjeđenja F. Uzorci bijelih i crnih vina analiziraju se bez ikakve posebne pripreme, osim razrjeđenja 1:20, pa prema tome faktor razrjeđenja F iznosi 20. Ukoliko je konverzija glicerola završena za otprilike 5 minuta, može se zaključiti da nije bilo interferencija. Ovo se može dalje provjeriti dodavanjem glicerola u kivetu nakon završetka reakcije (oko 20 µg u 0,1 mL), što treba dovesti do značajnog povećanja apsorbancije. Standard glicerola analizira se

samo kad postoji sumnja u točnost spektrofotometra, ali kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka.

### **Postupak:**

Valna dužina: 340 nm

Kiveta: širina 1 cm

Temperatura: 25 °C

Volumen uzorka (0,1–2 mL) koji sadrži 0,8–35 µg glicerola po kivetu.

Određivanje glicerola u uzorcima bijelih i crnih vina može se provesti bez prethodne obrade uzorka pa se uzorak samo razrjeđuje i to obično u omjeru 1:20 te se uzima 0,1 mL uzorka. Mjeriti prema zraku (bez kivete u spektrofotometru) ili prema vodi. Konačni volumen u kivetu iznosi 2,34 mL. Očitati prema zraku (bez kivete na putu svjetla) ili prema void (Tablica 7).

- Za određivanje glicerola korišten je komercijalno dostupni enzimski kit K-GCROL (Megazyme, Irska) koji sadrži reagense potrebne za 70 određivanja i spektrofotometar Varian Cary 3 UV/VIS Spectrophotometer, SAD

**Tablica 7.** Postupak pripreme uzoraka za provođenje glicerola pomoću enzimskog kita

Pipetirati u kivetu	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda (temperature oko 25 °C)	2,00 mL (2000 µL)	1,90 mL (1900 µL)
Uzorak	-	0,1 mL (100 µL)
Pufer	0,2 mL (200 µL)	0,2 mL (200 µL)
Otopina 2 (NADH/ATP/PEP/Tris HCl)	0,1 mL (100 µL)	0,1 mL (100 µL)
Suspenzija 3 (PK/L-LDH)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Zatvoriti parafilmom i promiješati (nježno okretati kivetu). Nakon otprilike 4 minute očitati apsorbanciju ( $A_1$ ) (kad završi reakcija koja se odvija kada se doda suspenzija 3) (PK/L-LDH).		
Suspenzija 4 (GK)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Zatvoriti parafilmom i nježno okretati kivetu radi miješanja. Očitati apsorbanciju ( $A_2$ ) na kraju reakcije (oko 5 minuta). Ako se reakcija nije zaustavila nakon 5 minuta onda nastavite očitavati apsorbanciju u intervalima od 2 minute sve dok se apsorbancija ne ustali.		



**Račun:**

Odrediti razliku apsorbancija ( $A_1 - A_2$ ) za slijepu probu i za uzorak. Potom razliku apsorbancija za slijepu probu oduzeti od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije  $\Delta A_{\text{glicerol}}$ . Ova vrijednost bi u pravilu trebala iznositi najmanje 0,1.

Koncentracija glicerola može se dalje izračunati prema jednadžbi:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \cdot \Delta A_{\text{glicerol}}$$

gdje je:

c - koncentracija glicerola [ $\text{g L}^{-1}$ ]

V - konačni volumen [mL] = 2,34 mL

MW - molarna masa glicerola [ $\text{g mol}^{-1}$ ] = 92,01

$\varepsilon$  - ekstinkcijski koeficijent NADH pri 340 nM =  $6300 [\text{l mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

d- put svjetlosti (1 cm)

v- volumen uzorka [mL] = 0,1 mL

### **3.1.8. Određivanje jabučne, mliječne, vinske, octene i limunske kiseline papirnom kromatografijom**

#### **Postupak:**

Pri rukovanju s kromatografskim papirom potrebno je raditi s kirurškim rukavicama. Za određivanje kiselina u uzorku vina koristi se kromatografski papir Whatman No. 1, koji se izreže na odgovarajuće dimenzije (55 x 192 mm). Na kromatografskom papiru povuče se grafitnom olovkom startna linija po širini papira na visini od 2,5 cm od osnovne. Na liniji se obilježe točke, na udaljenosti od 1,5 cm od ruba papira, na koje se nanosi po 50  $\mu\text{L}$  smjese standarda (sadrži po 3 g  $\text{L}^{-1}$  octene, vinske, mliječne i jabučne kiseline), odnosno uzorka vina. Nanosi se kap po kap, uz naknadno sušenje vrućim zrakom, točnije fenom, kako promjer nanosenih kapi ne bi prelazio 3 mm. Nakon nanošenja i sušenja, radi razvijanja kromatograma papir se stavlja u kadu za

kromatografiju u kojoj se nalazi ranije pripremljena smjesa otapala. Vrijeme razvijanja kromatograma je 2–3 sata, nakon čega treba označiti frontu otapala grafitnom olovkom prije nego se kromatogram počne sušiti. Nakon sušenja na zraku, kromatogram se uroni u otopinu indikatora i ponovno suši na zraku. Na temelju položaja mrlja na kromatogramu u odnosu na poznatu smjesu standarda,  $R_f$  vrijednost izračunava se prema izrazu:

$$R_f = \frac{\text{udaljenost od startne linije do središta mrlje}}{\text{udaljenost od startne linije do fronte otapala}}$$

$R_f$  srednja za vinsku kiselinu (standard) = 0,38

$R_f$  srednja za jabučnu kiselinu (standard) = 0,56

#### **Priprema smjese za razvijanje kromatograma:**

Octena kiselina    10 mL

n – butanol        40 mL

destilirana voda   50 mL

Smjesa octene kiseline, n–butanola i destilirane vode stavlja se u lijevak za odlijevanje i promućka, a kao razvijач koristi se gornja bistra faza. Nakon razvijanja i sušenja kromatograma, on se uroni u otopinu indikatora (bromfenol–plavo).

#### **Priprema otopine indikatora:**

100 mg bromfenol–plavog otopi se u apsolutnom etanolu o odmjernoj tikvici od 100 mL, te se doda 2–3 kapi 1M NaOH za potizanje lagano lužnate otopine.

### **3.1.9. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

#### **Princip :**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (High performance liquid chromatography, HPLC) je analitička metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između

dviju faza od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), dok se druga, pokretna (mobilna faza) kreće u određenom smjeru.

#### Postupak:

Uzorak vina se razrijedi 10 puta. U razrijeđenje je potrebno dodati  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  kako bi se mogli proteini istaložili budući da se proteini mogu taložiti na koloni. Uzorak se vorteksira 20 sekundi i pusti da odstoji 20 minuta. Nakon toga se centrifugira 5 minuta na  $10.000 \text{ o min}^{-1}$ . Na kolonu (Supelco C610H, 30 cm x 7,8 mm) injektira se 20  $\mu\text{L}$  (automatski uzorkivač) uzorka te postavi temperatura od  $55^\circ\text{C}$  i protok od  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Kao mobilna faza koristi se 0,1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a komponente se detektiraju RID-detektorom. Analiza se ponavlja kako bi se dobile dvije paralele radi kontrole rezultata. U ovom radu korišten je HPLC uređaj Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan).

### **3.1.10. Plinska kromatografija**

#### Princip :

Plinska kromatografija (gas chromatography ili GC) je metoda koja se koristi za separaciju organskih spojeva. Bazira se na distribuciji smjese komponenata između dvije faze. Komponente se kreću kroz kolonu pomoću plina nosioca (mobilne faze). Plinovi dušik, helij i vodik se koriste kao nosioci, a odabir među njima ovisi o vrsti detektora koji se koristi i specifičnosti primjene. Odvojene komponente izlaze iz kolone različitim brzinama ovisno o afinitetu komponenata prema stacionarnoj fazi. Detektirane komponente se elektronički prikazu na registratorskom pisaču u obliku pikova. Vrijeme izlaska svake pojedine komponente iz kolone karakteristično je za komponentu, a površina ispod pika je proporcionalna njenom udjelu.

### **3.1.10.1. Analiza hlapljivih komponenata pomoću plinske kromatografije**

#### Postupak:

Za ovu analizu korišten je plinski kromatograf PE Autosystem XL GC koji je integriran s headspace blokom (HS 40XL). Koristio se plameno-ionizacijski detektor (FID) i kolona ZB-5MS (Zebron, Phenomenex), 60 m x 0,25 mm I.D. x 0,50  $\mu\text{m}$   $d_f$ .

#### **Uvjeti rada headspace bloka:**

Temperatura pećnice: 100 °C

Vrijeme termostatiranja: 20 min

Vrijeme pod tlakom: 0,2 min

Vrijeme injektiranja: 0,05 min

Vrijeme uzimanja uzorka: 0,1 min

Viala zatvorena: da

Način rada headspace bloka: konstantan

Vrijeme trajanja jedne GC analize: 40 min

Plin nositelj: helij

Pritisak plina nositelja: 25 Psi

#### **Uvjeti rada plinskog kromatografa:**

Temperatura injektora: 110 °C

Temperatura detektora: 250 °C

Temperaturni program: 35 °C, 5 min; 10 °C/min → 60 °C; 60 °C, 2 min; 10 °C/min, 180 °C; 180 °C, 7 min

### **3.1.10.2. Analiza etanola pomoću plinske kromatografije**

#### Postupak:

Za analizu je korišten plinski kromatograf AE Autosystem HL GC. Detektor je plameno-ionizacijski, a kolona koja se koristila je vZB-WAXplus 30 m x 0,25 mm ID x 0,25  $\mu\text{m}$   $d_f$ .

Priprema uzorka: 150  $\mu\text{L}$  vina se pomiješa sa 150  $\mu\text{L}$  internog standarda (1-heksanol) i 1200  $\mu\text{m}$  etil-acetata. Uzorak potom profiltrirati kroz filter debljine 0,22  $\mu\text{m}$  ili podvrgnuti centrifugiranju.

**Uvjeti rada plinskog kromatografa:**

Volumen injektiranja: 1  $\mu\text{L}$

Temperatura injektiranja: 210  $^{\circ}\text{C}$

Protok kroz kolonu: 2,71  $\text{mL min}^{-1}$

Mobilna faza: etil-acetat

Linearna brzina: 52,8  $\text{cm s}^{-1}$

Temperatura detektora: 250  $^{\circ}\text{C}$

Temperaturni program: 90  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do 240  $^{\circ}\text{C}$ ; 240  $^{\circ}\text{C}$ , 4 min

Izračun:

Za izračun se koristio baždarni pravac za etanol:

$$\frac{A}{A_{\text{IS}}} = 0,058 * \varphi(\text{Etanol}) + 0,0032$$

$$R^2 = 0,99$$

$\varphi$  (Etanola)-volumni udio etanola

A - površina pika za etanol dobiven iz uzorka

$A_{\text{is}}$  - površina pika za interni standard

### 3.2. Materijali

Analizirano je domaće bijelo vino dobiveno kupažiranjem sorti Rajnski rizling, Pinot sivi i Pinot bijeli, proizvedeno 2016. godine u Zlatarskom vinogorju, podregija Zagorje Međimurje, unutar regije Kontinentalna Hrvatska.

Ostali materijali:

- 0,1 M NaOH
- 0,01 M NaOH
- 1M NaOH
- 25 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- $\text{H}_2\text{O}_2$
- 96% alkohol
- 30 %-tni KI
- 26 %-tna  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 1 %-tni škrob
- 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 1 %-tna glukoza
- 20%-tni KI
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (33,834 g/L)
- koncentrirana  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- Fehling I (69,3 g/L  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )
- Fehling II (346 g/L K,Na-tartarata)
- Destilirana voda
- Indikatori:
  - fenolftalein
  - metilno crvenilo

- bromfenol-plavo

- octena kiselina
- n – butanol
- Standard za papirnu kromatografiju (po 3 g/L jabučne, vinske, mliječne, octene i limunske kiseline)
- 0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- 10% otopina  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- Etil-acetat
- 1-heksanol
- Enzimski kit za određivanje glicerola K-GCROL (Megazyme, Irska)

### **3.3. Aparature**

- Laboratorijska aparatura za određivanje šećera
- Laboratorijska aparatura za određivanje alkohola
- Laboratorijska aparatura za određivanje sumpora
- Laboratorijska aparatura za određivanje hlapljivih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje ukupnih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje jabučne i vinske kiseline pomoću papirnatih kromatografija
- HPLC uređaj, Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- GC uređaj, PE Autosystem XL GC with Headspace Sampler (HS 40XL)
- Spektrofotometar Varian Cary 3 UV/VIS Spectrophotometer, SAD

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



## 4.1. Rezultati

### 4.1.1. Rezultati plinske kromatografije

#### 4.1.1.1. Rezultati analize hlapljivih spojeva u vinu pomoću plinske kromatografije

Tijekom analize provedene su tri paralele te su rezultati izraženi kao srednje vrijednosti. Tablica 8 prikazuje retencijska vremena i koncentracije nekih hlapljivih spojeva određenih u vinu pomoću HS-GC-FID metode. N-butanol se koristio kao interni standard u ovoj metodi.

**Tablica 8.** Retencijska vremena i koncentracije nekih hlapljivih spojeva određenih u vinu pomoću HS-GC-FID metode

Spoj	$t_R/\text{min}$	bijelo vino
		$\gamma \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$
acetaldehid	4,14	15,48±0,0025
propan-1-ol	6,37	19,14±0,031
butan-2-ol	7,46	n.d.
etil-acetat	7,71	39,40±0,0023
2-metil-propan-1-ol (i-propanol)	8,23	23,02±0,043
N-butanol (IS)	9,51	-
3-metil-butan-1-ol	12,26	124,67±0,013
2-metil-butan-1-ol	12,43	22,57±0,033
Etil-butirat	14,49	0,37±0,034
isoamil acetat	16,80	1,70±0,027
etil heksanoat	19,95	1,43±0,005
etil-oktanoat	24,25	0*
2-feniletilacetat	26,11	n.d.

n.d. = nije detektirano ; IS = interni standard ; 0\* = ispod limita detekcije

#### 4.1.1.2. Rezultati analize etanola pomoću plinske kromatografije

Analiza se provodila u 3 paralele te je rezultat prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $11,55 \pm 0,57$  vol.%).

#### 4.1.2. Rezultati analize parametara vina kemijskom metodom

U Tablici 9 su prikazani rezultati kemijske analize domaćeg bijelog vina u 3 paralele te su rezultati prikazani srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

**Tablica 9.** Rezultati kemijske analize domaćeg bijelog vina

	RS METODA (reducirajuće supstance) [g L <sup>-1</sup> ]	Ukupne kiseline [g L <sup>-1</sup> ]	Hlapljive kiseline [g L <sup>-1</sup> ]	Određivanje etanola [vol.%]	Određivanje SO <sub>2</sub>		
					Vezani SO <sub>2</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Slobodni SO <sub>2</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Ukupni SO <sub>2</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]
srednja vrijednost	5,205 $\pm$ 0,144	6,465 $\pm$ 0,003	0,42 $\pm$ 0,004	10,46 $\pm$ 0,022	129,6 $\pm$ 0	35,2 $\pm$ 0,23	164,8 $\pm$ 0,05

#### 4.1.3. Rezultati određivanja etanola denzimetrijskom metodom

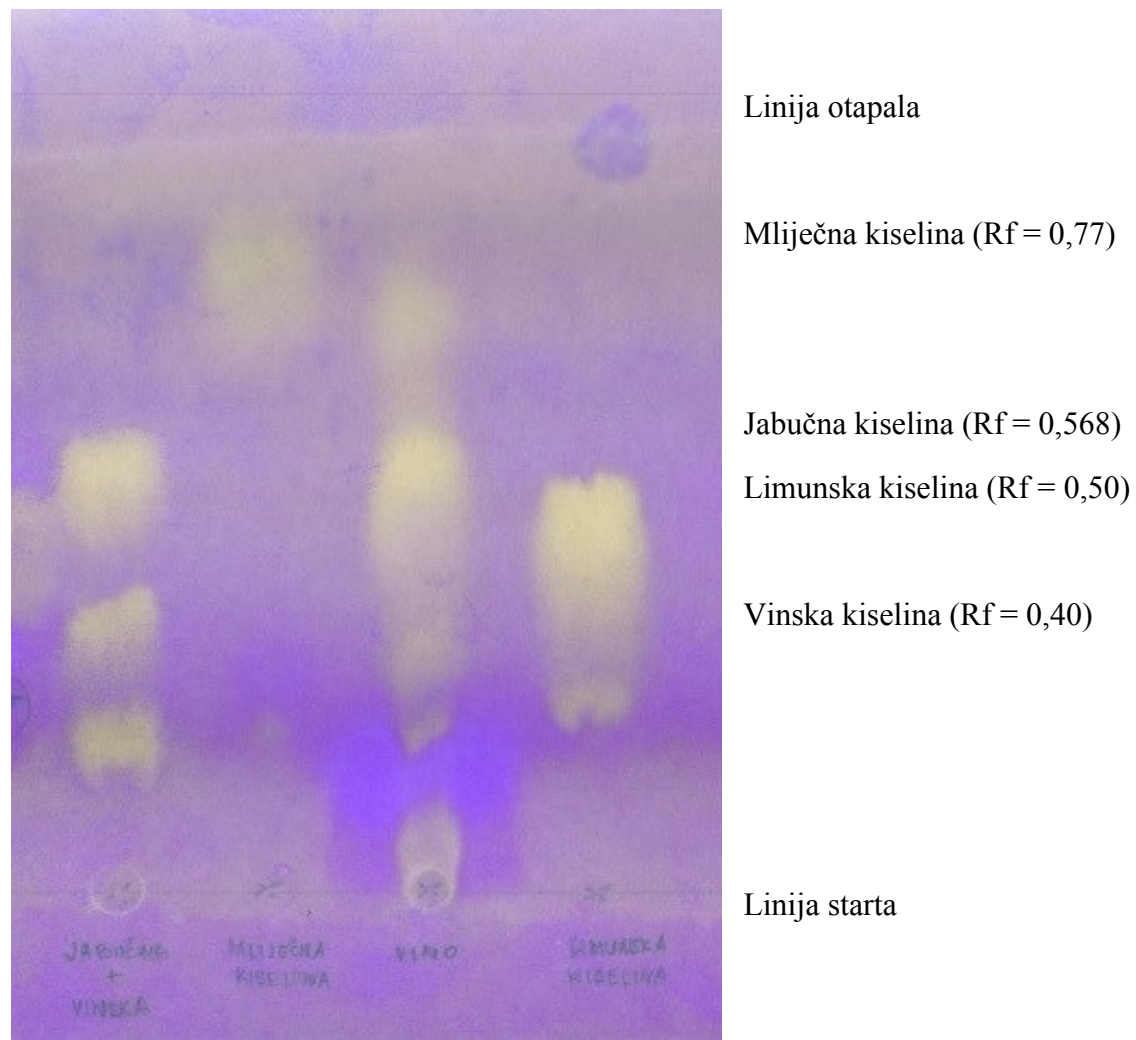
Analiza etanola se provodila u tri paralele te je rezultat prikazan kao srednja vrijednost ( $12,985 \pm 0,015$  vol.%).

#### 4.1.4. Rezultati određivanja glicerola

Masena koncentracija glicerola u vinu određena je pomoću enzimskog kita. Analiza se provodila u šest paralela te je rezultat prikazan kao srednja vrijednost. Koncentracija glicerola iznosila je  $5,34 \pm 0,001$  g L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.5. Rezultati papirne kromatografije

Na Slici 4. papirnom kromatografijom utvrđeno je da analizirano vino sadrži jabučnu ( $R_f = 0,568$ ) i vinsku kiselinu ( $R_f = 0,40$ ), dok mliječna, limunska i octena kiselina nisu detektirane.



Standard jabučne i vinske kiseline	Standard mliječne kiseline	Uzorak domaćeg bijelog vina	Standard limunske kiseline
------------------------------------	----------------------------	-----------------------------	----------------------------

**Slika 4.** Rezultati papirne kromatografije

#### 4.1.6. Rezultati analize dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tijekom analize provedene su tri paralele. U Tablici 10 prikazane su koncentracije ugljikohidrata, etanola i organskih kiselina prisutnih u vinu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

**Tablica 10.** Koncentracije glukoze, fruktoze, etanola i organskih kiselina prisutnih u domaćem bijelom vinu određenih HPLC metodom

	<b>bijelo vino</b>
<b>spoj</b>	<b><math>\gamma</math> (g L<sup>-1</sup>)/ <math>\phi</math> vol (%)<sup>a</sup></b>
glukoza	0,76 $\pm$ 0,03
fruktoza	n.d.
jabučna kiselina	7,89 $\pm$ 0,03
vinska kiselina	2,76 $\pm$ 0,20
limunska kiselina	n.d.
mliječna kiselina	n.d.
octena kiselina	n.d.
etanol	11,50 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
glicerol	5,67 $\pm$ 0,11

## **4.2. Rasprava**

Na temelju članka 56. stavka 1. Zakona o vinu ("Narodne novine", br. 34/95), ministar poljoprivrede i šumarstva donosi Pravilnik o vinu koji sadrži niz podjela i pravila kojih se potrebno pridržavati tijekom proizvodnje vina.

Prema članku 3. Pravilnika o vinu Vinogradarska regija Kontinentalna Hrvatska dijeli se na ove podregije: Podunavlje, Slavonija, Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje-Međimurje.

Prema članku 4. Pravilnika o vinu podregija Zagorje-Međimurje dijeli se na ova vinogorja: Međimursko, Varaždinsko, Ludbreško, Krapinsko, Zlatarsko (Zlatar, Lobar, Mače, Zlatar Bistrica, Konjščina, Hrašćina, Budinščina) i Zabočko.

Prema članku 5. Pravilnika o vinu vinogradarsko područje Hrvatske razvrstano je u sljedeće zone proizvodnje:

1. Zona B obuhvaća: Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje-Međimurje.
2. Zona C1 obuhvaća: Podunavlje, Slavonija.
3. Zona C2 obuhvaća: Istra, Hrvatsko Primorje i Dalmatinska Zagora.
4. Zona C3 obuhvaća: Sjeverna, Srednja i Južna Dalmacija.

Prema članku 7. Pravilnika o vinu navedene su sorte koje se smiju saditi u regijama Kontinentalne Hrvatske:

U podregiji Zagorje-Međimurje preporučene sorte su rizling rajnski bijeli, traminac crveni, traminac mirisavi, graševina bijela, moslavac bijeli, sauvignon bijeli, pinot bijeli, pinot sivi, silvanac zeleni, chardonnay bijeli, rizvanac bijeli, muškat žuti, muškat ottonel bijeli, portugizac crni, pinot crni, a dopuštene sorte štajerska belina, zelenac slatki bijeli, veltlinac crveni, kraljevina crvena, plavec žuti, šipelj bijeli, lovrijenac crni, gamay bojadiser crni, frankovka crna, kavčina crna.

Analizirano domaće bijelo vino u ovom radu pripada podregiji Zagorje-Međimurje (Zona B) te Zlatarskom vinogorju (Konjščina). Sorte od kojih se sastoji ovo vino Rajnski rizling te

Pinot sivi i Pinot bijeli, prema ovom pravilniku uvrštene su pod preporučene sorte koje bi se trebale uzgajati na spomenutom području.

Prema članku 39. Pravilnika o vinu najmanji sadržaj stvarnog alkohola u vinu u prometu mora biti (u volumnim %):

zona B – stolno vino 8,5, kvalitetno 9,5, a vrhunsko 10,0

zona C1- stolno vino 9,5, kvalitetno 10, vrhunsko 10,5

zona C2 – stolno vino 10, kvalitetno 10,5, vrhunsko 11,0

zona C3 – stolno vino 10,5, kvalitetno 11,0, vrhunsko 11,5

Prema članku 46. vino u prometu mora sadržavati:

- najmanje 4,5 g L<sup>-1</sup>, a najviše 14 g L<sup>-1</sup> ukupnih kiselina izraženih kao vinska kiselina
- najviše 4 g L<sup>-1</sup> neprevrelog šećera za suho vino, od 4 g L<sup>-1</sup> do 12 g L<sup>-1</sup> za polusuho vino, od 12 g L<sup>-1</sup> do 50 g L<sup>-1</sup> za poluslatko vino i za slatko iznad 50 g L<sup>-1</sup> neprevrelog šećera
- najmanje 5 g L<sup>-1</sup> glicerola
- najviše 210 mg L<sup>-1</sup> sumpornog dioksida za bijela i ružičasta vina, od toga slobodnog najviše 40 mg L<sup>-1</sup>; crna vina smiju sadržavati najviše 160 mg L<sup>-1</sup>, od toga slobodnog najviše 30 mg L<sup>-1</sup>
- limunsku kiselinu najviše 1 g L<sup>-1</sup>, a octena kiselina ne smije biti veća od 0,8 g L<sup>-1</sup> u moštu, u fermentaciji i mladom vinu, 1 g L<sup>-1</sup> u ružičastim i bijelim vinima, 1,2 g L<sup>-1</sup> u crnim vinima, 1,8 g L<sup>-1</sup> u desertnim vinima.

Vino sadrži 6,465 g L<sup>-1</sup> ukupnih kiselina te 0,42 g L<sup>-1</sup> hlapljivih kiselina što je unutar granica Pravilnika o vinu. Hlapljive kiseline su i pokazatelj kvalitete i zdravstvenog stanja grožđa, stoga se po rezultatima vidi da nije bilo aktivnosti octenih bakterija te da je vino zdravo.

Sadržaj reducirajućih šećera iznosi 5,205 g L<sup>-1</sup> vina. HPLC-om je je utvrđeno 0,76 ± 0,03 g L<sup>-1</sup> glukoze, a fruktoza nije detektirana, pa stoga analizirano vino spada u suha vina. Grožđe sadrži oko 15 - 25% glukoze i fruktoze koji se tijekom fermentacije uglavnom pretvaraju u alkohol. U suhim vinima šećeri se uglavnom nalaze u tragovima (0,1%), dok u slatkim mogu biti i preko 10 %.

Međutim, slatkoća vina ne potječe samo od šećera, već i od alkohola. Reducirajući šećeri su svi šećeri koji imaju aldehidnu ili keto funkcionalnu skupinu, a njihovo određivanje vezano je za redukciju alkalne otopine bakar (II) soli. Šećeri koji ne fermentiraju, već ostaju u vinu nazivaju se rezidualni šećeri.

Analizom je utvrđeno da domaće bijelo vino sadrži 35,2 mg L<sup>-1</sup> slobodnog te 164,8 mg L<sup>-1</sup> ukupnog SO<sub>2</sub>. Prema članku 46. Pravilnika o vinu, ružičasto i bijelo vino smiju imati najviše 210 mg L<sup>-1</sup> ukupnog SO<sub>2</sub>, od toga najviše 40 mg L<sup>-1</sup> slobodnog SO<sub>2</sub>. Što se tiče sumpora, analizirano vino i po ovom parametru spada unutar granica određenih Pravilnikom o vinu.

HPLC-om su određene jabučna (7,89 g L<sup>-1</sup>) i vinska kiselina (2,76 g L<sup>-1</sup>), a limunska, mliječna i octena kiselina nisu detektirane. Rezultati papirne kromatografije potvrdili su rezultate dobivene HPLC-om. HPLC se primjenjuje u analizi hrane (pesticidi, toksini, antibiotici, boje zaslađivači, hormoni, vitamini, aminokiseline), farmaceutici (određivanje koncentracije aktivnih komponenti u lijekovima, vrijeme poluraspada, kontrola kvalitete), medicini (određivanje metabolita u biološkim tekućinama itd.), analizi okoliša (eksplozivi, fenoli, policiklički aromatski ugljikovodici), forenzici (droga, sterodi, psihoterapeutske lijekovi) i organskoj kemiji.

Aromu vina čini nekoliko stotina raznih hlapljivih spojeva koji se nalaze u vinu. To su prvenstveno terpenijski spojevi (linalol, geraniol, nerol i dr.) i alkoholi sa šest ugljikovih atoma (1-heksanol, 2-heksanol, trans i cis oblici 2- i 3-heksen-1-ol). Alkoholna fermentacija je posebno važna za razvoj arome vina. Tijekom alkoholne fermentacije odvijaju se bitne promjene kojima spojevi arome mošta ili masulja prelaze u spojeve arome vina. Utvrđeno je da se tijekom alkoholne fermentacije u najvećem udjelu formiraju viši alkoholi, esteri, hlapljive kiseline i karbonilni spojevi. Fermentacijskoj aromi analiziranih uzoraka najviše doprinose acetatni esteri: izoamil, heksil, feniletil acetat, koji su nosioci voćnih i cvjetnih aroma mladih vina. Ukupnoj fermentacijskoj aromi vina također doprinose i monoterpenijski alkoholi linalol i  $\alpha$ -terpineol. Vino zadržava najviše koncentracije ukupnih sortnih aroma ukoliko se fermentacija vodi pri temperaturi od 16 °C, dok najviše koncentracije fermentacijskih aroma ima vino fermentirano na 18 °C. Stoga je temperatura jedan od najvažnijih čimbenika fermentacije budući da utječe na kinetiku procesa, a što se odražava na brzinu procesa i duljinu trajanja, ali i utjecaja na kvalitetu konačnog proizvoda, ponajviše zbog proizvodnje sekundarnih metabolita (Lambrechts i Pretorius, 2000; Swiegers i sur., 2005). Upravo sekundarni metaboliti kao što su viši alkoholi, esteri, glicerol, jantarna kiselina, diacetil, acetoin, 2,3

butanidiol i mnogi drugi uvelike doprinose kompleksnosti budućeg vina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Osim sinteze sekundarnih aroma, temperatura fermentacije igra veliku ulogu u očuvanju sortnih aroma, kao i njihovom oslobađanju iz nehlapljivih prekusora (Swiegers i sur., 2005).

Plinskom kromatografijom dokazana je prisutnost hlapljivih spojeva: viših alkohola, estera i aldehida, koji su proizvodi alkoholne fermentacije. Viši alkoholi su spojevi koji izrazito doprinose aromi vina. Od viših alkohola u većim koncentracijama u analiziranom vinu prisutan je 3-metil-butan-1-ol ( $124,67 \text{ mg L}^{-1}$ ), a propan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol i 2-metil-butan-1-ol prisutni su u manjim koncentracijama dok butan-2-ol nije detektiran. Može se zaključiti da je temperatura fermentacija bila viša, jer je od viših alkohola bio prisutan u većoj koncentraciji samo 3-metil-butan-1-ol, dok su ostali viši alkoholi bili prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Od estera je najzastupljeniji etil-acetat ( $39,40 \text{ mg L}^{-1}$ ), a prisutni su još i etil butirat, izoamil acetat i etil heksanoat. 2-feniletilacetat nije detektiran, a etil-oktanoat je bio ispod limita detekcije. Što se tiče aldehida, analiziran je samo acetaldehid ( $15,48 \text{ mg L}^{-1}$ ), koji je i najzastupljeniji aldehid u vinu, a on vinu daje miris po kiselim, zelenim jabukama.

Etanol je analiziran pomoću kemijske metode, denzimetrijske metode, HPLC-om i plinskom kromatografijom (GC). Rezultati analize etanola pomoću HPLC i GC metoda se poklapaju te iznose 11,50 % (vol/vol), odnosno 11,55 % (vol/vol). Etanol određen kemijskom metodom iznosi 10,46 % (vol/vol), a denzimetrijskom 12,98 % (vol/vol). Do odstupanja je moglo doći zbog analitičke pogreške. Denzimetrijska metoda je izrazito nepouzdana i neponovljiva te se prilikom analize može javiti velik rasap između rezultata.

Glicerol je proizvod sekundarne fermentacije, a nastaje u prvoj fazi alkoholne fermentacije (glicerinsko-pirogroždanoj fermentaciji) redukcijom jedne od trioza i to fosfoglicerinaldehida preko međuproizvoda glicerofosforne kiseline. Veća ili manja količina glicerola u vinu, a obično između 7 -  $14 \text{ g L}^{-1}$ , ovisi o količini šećera u moštu. Analiza glicerola provedena je pomoću enzimskog kita i HPLC metode te se rezultati poklapaju. HPLC metodom dobiveno je  $5,67 \text{ g L}^{-1}$ , a enzimskim kitom  $5,34 \text{ g L}^{-1}$  glicerola. Ovi rezultati slažu se i s Pravilnikom o vinu čiji članak 46. kaže da vino mora sadržavati najmanje  $5 \text{ g L}^{-1}$  glicerola.



## **5. ZAKLJUČCI**

Nakon analize domaćeg bijelog vina proizvedenog 2016. godine kupажiranjem sorti Rajnski rizling, Pinot sivi i Pinot bijeli može se zaključiti:

1. Veća prisutnost viših alkohola poput 3-metil-butan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-butan-1-ol, propan-1-ol, a manje estera poput etil-acetata, isoamilacetata, etilheksanoata i etil-butirata ukazuje da se fermentacija odvijala pri višim temperaturama. Koncentracija estera bi se mogla povećati odležavanjem vina.
2. Od aldehida je određen samo acetaldehid ( $15,48 \text{ mg L}^{-1}$ ), koji je i najzastupljeniji aldehyd u vinu.
3. Sadržaj alkohola iznosio je 11,525 % (vol/vol) (aritmetička sredina preciznijih metoda HPLC i GC).
4. Proizvedeno je suho vino (zaostalo je  $0,76 \text{ g L}^{-1}$  glukoze, dok fruktoza nije detektirana prema HPLC metodi).
5. Koncentracije glicerola ( $5,505 \text{ g L}^{-1}$  – prikazana kao aritmetička sredina rezultata dobivenih HPLC-om i enzimskim kitom), ukupnih kiselina ( $6,465 \text{ g L}^{-1}$ ) i hlapljivih kiselina ( $0,42 \text{ g L}^{-1}$ ) te vezanog  $\text{SO}_2$  ( $129,6 \text{ mg L}^{-1}$ ), slobodnog  $\text{SO}_2$  ( $35,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) i ukupnog  $\text{SO}_2$  ( $164,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) su unutar zakonskih okvira.
6. HPLC-om su određene vinska kiselina ( $2,76 \text{ g L}^{-1}$ ) i jabučna kiselina ( $7,89 \text{ g L}^{-1}$ ), što je potvrđeno i papirnom kromatografijom.
7. Svi analizirani parametri odgovaraju zakonskom okviru Pravilnika o vinu iz 1996. godine kojeg je izdalo Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva.

## **6. LITERATURA**

Anonymous 1, (2011) <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=aroma>, pristupljeno 6.7.2017.

Anonymous 2 (2009) <http://www.rast-bs.si/CRO/katalog/vinova-loza/vinova-loza-bijele-sortegrozda-za-bijelo-vino/313>, pristupljeno 6.7.2017.

Anonymous 3, (2013) [https://hr.wikipedia.org/wiki/Pinot\\_sivi](https://hr.wikipedia.org/wiki/Pinot_sivi), pristupljeno 7.7.2017.

Anonymous 4, (2013) [https://www.krizevci.net/vinograd/htm/sorte/09\\_pinot\\_bijeli.html](https://www.krizevci.net/vinograd/htm/sorte/09_pinot_bijeli.html), pristupljeno 7.7.2017.

Anonymous 5, (2014) <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=1826>, pristupljeno 7.7.2017.

Bisson, L. F. (1999) Stuck and sluggish fermentations. *Am. J Enol. Vitic.* **50**, 107-119.

Blesić, M., Mijatović D., Radić G., Blesić S. (2013) Praktično vinogradarstvo i vinarstvo. Štamparija Fojnica d.o.o., Sarajevo, str. 143-153.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1996) Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, International Thomson Publishing, New York, str. 102-192.

Bratowsky, E. J., Henschke, P. A. (2004) The “buttery” attribute of wine-diacetyl- desirability, spoilage and beyond. *Int. J Food Micro.* **96**, 23-252.

Bueno, J. E., Peinado, R. A., Medina, M., Moreno, J. (2006) Effect of a short contact time with lees on volatile composition of Arien and Macabeo wines. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1007-1011.

Dančić, M. (1988) Tehnologija vina – praktikum, meten-Zemun, Beograd.

Dittrich, H. H. (1995) Wine and brandy. U: Biotechnology, Enzymes, Biomass, Food and Feed, Vol. 9 (Rehm, H. J., Reed G., Pühler, A., Stadler, P., Reed G., Nagodawithana T. W., ured.), VCH, Weinheim, str. 464-503.

Esti, M., Tamborra, P. (2006) Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 173-179.

Fazinić N., Milat V. (1994) Hrvatska vina, Mladinska knjiga Zagreb, Zagreb, str. 45.

Fleet, G. H. (1993) The microorganisms of winemaking – Isolation, enumeration and identification. U: Wine microbiology and biotechnology, (Fleet, G. H., ured.), Harwood Publishers, Chur, Switzerland, str. 1-25.

Fleet, G. H., Heard, G. M. (1993) Yeasts: Growth during fermentation. U: Wine Microbiology and Biotechnology, (Fleet, G. H., ured.), Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, str. 27-54.

Giudici, P., Romano, P., Zambonelli, C. (1990) A biometric study of higher alcohol production from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J. Microbiol.* **36**, 61-64.

Henschke, P. A., Jiranek, V. (1993) Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. U: Wine Microbiology Biotechnology, (Fleet, G. H., ured.) Harwood Academic Publishers, Switzerland, str. 77-164.

Herraiz, T. (1990) Production of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during the alcoholic fermentation of grape must in presence or absence of SO<sub>2</sub>. *Belg. J. Food Chem. Biotech.* **45** (2), 57-62.

Herraiz, T., Reglero, G., Herrera, M., Martin-Alvarez, P. J., Cabezero, M. D. (1990) The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **41** (4), 313-318.

Jackson, R. S. (1994) Fermentation. U: Wine Science. Principles and applications, (Jackson, R. S., ured.) Academic Press, San Diego, str. 220-276.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A. (1995) Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 75-83.

Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, Special Issue, str. 97-129.

Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I., Preiner D., Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S., Žulj Mihaljević M., Ilijaš I., Marković D. (2015) Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze. Državni zavod za zaštitu prirode. Zagreb, str. 36-38.

- Malik, F. (1998) Bases of enology. U: Bioprocess engineering course, (Berovič, M., ured.), National Institute of Chemistry, Ljubljana, str. 182-205.
- Mauricio, J. C., Moreno, J., Zea, L., Ortega, J. M., Medina, M. (1997) The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Sci. Food Agric.* **75**, 155-160.
- MacDonald, J., Reeve, P. T. V., Ruddlesden, J. D., White, F. H. (1984) Current approaches to brewery fermentations. U: Progress in Industrial Microbiology, Modern applications of traditional biotechnologies, (Bushell, M. E., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 47-98.
- Mirošević N., Vinogradarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1996, str. 67.
- Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, L. (2001) Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Anal. Chim. Acta.* **458**, 157-167.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo M. C. (2009) Wine chemistry and biochemistry. (Moreno-Arribas, M. V., Polo M. C Springer, ured.), New York, str. 456-678.
- Nordström, K. (1964) Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. *J Inst. Brew.* **67**, 173-181.
- Nykänen, L. (1986) Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 84-96.
- Park, S. K., Noble, A. C. (1993) Monoterpenes and monoterpene glycosides in wine aromas. *Acs. Sym. Ser.* **536**, 98-109.
- Plata, M. C., Mauricio, J. C., Millán, C., Ortega, J. M. (2003) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Micro.* **20**, 217-224.
- Pretorius, J. S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729.
- Raineri, S., Pretorius, I.S. (2000) Selection and improvement of wine yeast. *Ann. microbiol.* **50**, 15-30.

Rapp, A., Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia* **42**, 873-884.

Rauhut, D. (1993) Yeasts – production of sulfur compounds. U: Wine microbiology and biotechnology, Fleet, G. H. (ured.), Harwood Academic Publishers, str. 243-264.

Ribèreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of enology. 2. izd., The chemistry of wine stabilization and treatments. John Wiley & Sons, West Sussex, str. 201-231.

Robinson, J. (1999) Lifestyle winery. U: The Oxford Companion to Wine, Robinson, J. (ured.). 2. izd., Oxford University Press, Oxford.

Suomalainen, H., Lehtonen, M. (1979) The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.* **85**, str. 149-156.

Swiegers, J. H. , Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Austr. J. Grap. Wine Res.* **11**, 139-173.

Torrea, D., Ancin, C. (1999) Use of nitrogen compounds in spontaneous a inoculated wine fermentations. *J Agric. Food. Chem.* **47**, 4018-4024.

Torrea, D., Fraile, P., Garde, T., Ancin, C. (2002) Production of volatile compounds in the fermentation of Chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Con.* **14**, 565-571.

Ugliano, M., Bratowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., Henschke, P. A. (2006) Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J Agri. Food Chem.* **54**, 6322-6331.

Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., Edwards, C. G. (2002) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J Appl. Micro.* **94**, 349-359.

Zakon o vinu (2003) *Narodne novine* **96**, (NN 96/2003).